

Université de Montréal

**Effet du CP-3(iv), un ligand du récepteur CD36, sur le stress oxydatif suite à
une ischémie cardiaque transitoire chez la souris**

par

Liliane Ménard

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Janvier, 2015

© Liliane Ménard, 2015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Effet du CP-3(iv), un ligand du récepteur CD36, sur le stress oxydatif suite à
une ischémie cardiaque transitoire chez la souris**

présenté par :

Liliane Ménard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Denis DeBlois

Présidente-rapporteuse

Sylvie Marleau

Directrice de recherche

Huy Ong

Codirecteur de recherche

Véronique Michaud

Membre du jury

Résumé

Le récepteur éboueur CD36 facilite l'internalisation des acides gras libres non estérifiés (AGNE) au niveau des tissus cardiaque et périphériques. Lors d'une ischémie-reperfusion du myocarde (MI/R), les dommages produits sont en partie liés à l'internalisation des AGNE et à la production d'espèces réactives de l'oxygène, contrairement à ce qui est observé chez des souris déficientes en CD36 (CD36^{-/-}). Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le CP-3(iv), un ligand synthétique du récepteur CD36, exercerait un effet cardioprotecteur en réduisant la taille de la zone myocardique infarctée lors d'une ischémie transitoire du myocarde. Nos objectifs étaient 1) de déterminer l'effet cardioprotecteur du CP-3(iv) et 2) de définir son mécanisme. Pour cela, des études *in vivo* et *ex vivo* ont été faites. Des souris de type sauvage ont été traitées avec le CP-3(iv) (289 nmol/kg) par voie sous-cutanée pendant 14 jours avant d'être soumises à 30 minutes d'ischémie suivant la ligature de l'artère coronaire gauche descendante et de sa reperfusion pendant une période de 6 ou 48 heures. De plus, des cœurs isolés de souris ont été perfusés 30 minutes, suivi de 40 minutes à faible débit (10%) et de 30 minutes de reperfusion pendant laquelle le cœur est perfusé avec le CP-3(iv) à une concentration de 10^{-6} M. Nos travaux ont montré que l'effet cardioprotecteur d'un traitement préventif par le CP-3(iv) permet de diminuer la taille de l'infarctus et préserve l'hémodynamie cardiaque de façon dépendante du CD36 puisque cet effet est non visible chez les souris CD36^{-/-}. De plus, le CP-3(iv) exerce non seulement un effet systémique, mais aussi un effet cardioprotecteur direct sur le cœur isolé.

Mots-clés : CD36, cœur, ischémie-reperfusion, adiponectine, ROS

Summary

The scavenger receptor CD36 facilitates the internalization of non-esterified fatty acids (NEFA) on cardiac and peripheral tissues. During myocardial ischemia and reperfusion (MI/R), the damage induced is in part related to the internalization of NEFA and the production of reactive oxygen species, in opposition to what is observed in CD36-deficient mice (CD36^{-/-}). We hypothesized that CP-3(iv), a synthetic ligand of the CD36 receptor, provides a cardioprotective effect by reducing the infarct area during a transient myocardial ischemia. Our objectives were 1) to determine the cardioprotective effect of CP-3(iv) and 2) to define its mechanism. For this, *in vivo* and *ex vivo* studies have been done. Wild-type mice were treated with CP-3(iv) (289 nmol/kg) subcutaneously during 14 days before being submitted to 30 minutes of ischemia following left anterior descending coronary artery ligation and reperfusion for a period of 6 to 48 hours. In addition, isolated mouse hearts were perfused 30 minutes, followed by 40 minutes with low flow (10%) and 30 minutes of reperfusion during which the heart is perfused with CP-3(iv) at a concentration of 10^{-6} M. Our work has shown that the cardioprotective effect of preventive treatment with CP-3(iv) reduces the infarct size and preserves cardiac hemodynamics in a CD36-dependent manner because this effect is not visible in CD36^{-/-} mice. In addition, CP-3(iv) not only exerts a systemic effect, but also a direct cardioprotective effect on the isolated heart.

Key words: CD36, heart, ischemia-reperfusion, adiponectin, ROS

Table des matières

Résumé.....	iii
Summary	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures	xi
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xxii
1. INTRODUCTION	1
<i>1.1. Les maladies cardiovasculaires</i>	<i>2</i>
1.1.1. Les statistiques	3
1.1.2. Les différents types de maladies cardiovasculaires.....	4
1.1.2.1. Les maladies cardiovasculaires non-ischémiques	4
1.1.2.2. Les maladies cardiovasculaires ischémiques	6
<i>1.2. Les fonctions cardiaques</i>	<i>7</i>
1.2.1. La pompe cardiaque	7
1.2.1.1. Le système de conduction cardiaque.....	8
1.2.1.2. La contraction.....	9
1.2.1.3. La circulation.....	10
1.2.2. La sécrétion d'hormones	11
1.2.2.1. Les peptides natriurétiques.....	11

1.2.2.2.	L'adiponectine.....	14
1.2.3.	Le métabolisme énergétique cardiaque	20
1.2.3.1.	L'utilisation des acides gras comme source d'énergie.....	21
1.2.3.2.	L'utilisation des glucides comme source d'énergie	22
1.2.4.	La maladie cardiaque ischémique	24
1.2.4.1.	L'ischémie-reperfusion du myocarde (MI/R)	24
1.2.4.2.	L'ischémie.....	24
1.2.4.3.	La reperfusion	26
1.3.	Les composantes du cœur	29
1.3.1.	Les vaisseaux.....	29
1.3.2.	Les cardiomyocytes.....	30
1.3.2.1.	Les mitochondries	30
1.3.2.1.1.	Le rôle des mitochondries dans le MI/R	38
1.3.2.1.2.	L'ouverture du mPTP.....	42
1.3.2.2.	Le récepteur éboueur CD36	43
1.3.2.2.1.	La structure du CD36	46
1.3.2.2.2.	La répartition/distribution du récepteur CD36	49
1.3.2.2.3.	Les nombreux rôles du CD36	52
1.3.2.2.3.1.	Les nombreux ligands endogènes du récepteur CD36	54
1.3.2.2.3.2.	Les nombreux ligands exogènes du récepteur CD36	56
1.3.2.2.4.	Le rôle du CD36 dans le métabolisme des acides gras et des triglycérides	60
1.3.2.2.5.	L'interaction du CD36 avec l'APN.....	61

1.4.	Hypothèse de recherche	63
1.5.	Objectifs	63
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	65
2.1.	Modèle expérimental.....	66
2.2.	Ligature de l'artère coronaire descendante gauche	66
2.2.1.	Sacrifice.....	68
2.2.2.	Détermination de la taille de l'infarctus	68
2.3.	Perfusion de cœurs isolés en mode Langendorff	69
2.4.	Fonction cardiaque <i>in vivo</i>	71
2.5.	Méthodes d'analyse.....	71
2.5.1.	Concentrations sanguines de glucose et de lactate.....	71
2.5.2.	Concentration plasmatique de troponine I cardiaque.....	72
2.5.3.	Concentrations plasmatiques d'adiponectine totale et de haut poids moléculaire	72
2.5.4.	Chimioluminescence	74
2.5.4.1.	Dans le sang	74
2.5.4.2.	Dans l'homogénat cardiaque.....	74
2.5.5.	Isolation des fibres myocardiques.....	75
2.5.5.1.	Mesure de la production de ROS dans les fibres myocardiques.....	76
2.5.5.2.	Mesure de l'ouverture du mPTP	77

2.5.6.	Activité de l'aconitase	78
2.5.7.	Activité des caspases 3 et 9	79
2.6.	Analyse statistique.....	80
3.	RÉSULTATS.....	82
3.1.	Effet du CP-3(iv) sur les dommages induits lors d'une ischémie-reperfusion du myocarde	83
3.2.	Effet du CP-3(iv) sur les niveaux sanguins de lactate et de glucose.....	83
3.3.	Effet du CP-3(iv) sur les niveaux plasmatiques d'AGNE, de TG et d'APN	86
3.4.	Effet du CP-3(iv) sur la production de ROS	89
3.5.	Effet du CP-3(iv) sur l'ouverture du mPTP	91
3.6.	Effet du CP-3(iv) sur l'activité de l'aconitase et des caspases.....	92
3.7.	Effet du CP-3(iv) sur les fonctions cardiaques.....	93
3.7.1.	In vivo	93
3.7.2.	Ex vivo (cœur isolé)	95
4.	DISCUSSION.....	100
4.1.	Le CP-3(iv) diminue la taille de l'infarctus après une MI/R.....	101
4.2.	Le CP-3(iv) n'affecte pas les niveaux plasmatiques de TG et d'AGNE.....	102
4.3.	Le CP-3(iv) augmente le niveau plasmatique d'APN de haut poids moléculaire....	104
4.4.	Le CP-3(iv) diminue la production de ROS dans les cardiomyocytes.....	106
4.5.	Le CP-3(iv) améliore la fonction cardiaque <i>in vivo</i>	110

4.6.	Le CP-3(iv) améliore la fonction cardiaques <i>ex vivo</i>	111
4.7.	Le CP-3(iv), un avenue thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires	112
4.8.	Conclusion.....	113
4.9.	Perspectives	114
Références		115

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau 1.1. Caractéristiques des maladies ischémiques et non-ischémiques5

Tableau 1.2. Résumé des anomalies génétiques possibles au niveau du récepteur

CD36 chez les personnes ayant une déficience en CD36 de type I ou II...45

RÉSULTATS

Tableau 1. Effet du CP-3(iv) sur la fonction cardiaque chez les souris WT ayant subi
une ischémie de 30 minutes suivi de 48 heures de reperfusion.....93

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1.1 Le système de conduction du cœur menant à la contraction.....	9
Figure 1.2 Structure du cœur.....	11
Figure 1.3 Récepteurs et signalisation des peptides natriurétiques	13
Figure 1.4 Structure de l'adiponectine.....	15
Figure 1.5 Formation de l'acétyl-CoA à partir du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase.....	23
Figure 1.6 La β -oxydation des acides gras.....	33
Figure 1.7 Les huit étapes du cycle de l'acide citrique (de Krebs).....	34
Figure 1.8 Phosphorylation oxydative : chaîne de transport des électrons.....	36
Figure 1.9 Production de ROS par les complex I et III de la chaîne de transport des électrons.....	40
Figure 1.10 Structure du récepteur CD36 montrant les différents sites de liaison de ses ligands.....	48

RÉSULTATS

Figure 1. Effet du CP-3(iv) sur la taille de l'infarctus à la suite d'une ischémie de 30 minutes suivie de 48 heures de reperfusion chez les souris WT.....	83
Figure 2. Effet du CP-3(iv) sur la taille de l'infarctus à la suite d'une ischémie de 30 minutes suivie de 48 heures de reperfusion chez les souris déficientes en CD36...	84
Figure 3. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux sanguins de lactate et de glucose à 6 heures de reperfusion chez les souris WT et CD36-/-.....	85

Figure 4. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux plasmatiques de TG et de AGNE à 6 heures de reperfusion chez les souris WT	86
Figure 5. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux plasmatiques d'APN de haut poids moléculaire et totale chez les souris WT et CD36-/- après 6 et 48 heures de reperfusion.....	87
Figure 6. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux sanguin et cardiaque de ROS à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.....	89
Figure 7. Effet du CP-3(iv) sur la production de ROS mitochondriaux à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.....	90
Figure 8. Effet du CP-3(iv) sur le temps d'ouverture du mPTP et l'absorption du calcium par les mitochondries à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.....	91
Figure 9. Effet du CP-3(iv) sur l'activité de l'aconitase et des caspases 3 et 9 à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.....	92
Figure 10. Effet du CP-3(iv) sur le RPP chez le cœur isolé de souris WT après 30 minutes de perfusion à pression constante suivi de 40 minutes de perfusion à 10% du débit initial et 30 minutes de reperfusion.	95
Figure 11. Effet du CP-3(iv) sur la pression artérielle moyenne chez le cœur isolé de souris WT exposé à 30 minutes de perfusion à pression constante à 10% du débit initial, suivie de 40 minutes de perfusion.	96
Figure 12. Effet du CP-3(iv) sur le RPP chez le cœur isolé de souris CD36-/- soumis à 30 minutes de perfusion à pression constante à 10% du débit initial, suivie de 40 minutes de reperfusion.	97

Figure 13. Effet du CP-3(iv) sur les fonctions cardiaques chez le cœur isolé de souris

CD36^{-/-} soumis à 30 minutes de perfusion à pression constante à 10% du
débit initial suivie de 40 minutes de reperfusion.98

Liste des abréviations

a.a., acide aminé

AAR, zone à risque (*area at risk*)

ACC, acétyl coenzyme A carboxylase

ACO, acyl-CoA oxydase

AdipoR1, récepteur 1 de l'APN

AdipoR2, récepteur 2 de l'APN

ADN, acide désoxyribonucléique

ADP, adénosine diphosphate

AGLC, acide gras à longue chaîne

AGNE, acide gras non-estérifié

Akt, protéine kinase B (PKB)

AM, domaine associé à la membrane

AMP, adénosine monophosphate

AMPC, adénosine monophosphate cyclique

AMPK, *AMP-activated protein kinase*

ANP, peptide natriurétique auriculaire (*atrial natriuretic peptide*)

Apaf-1, apoptotic peptidase activating factor-1

apoE, apolipoprotéine E

APN, adiponectine

APPL1, *adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain and a leucine zipper motif 1*

ARNm, acide ribonucléique messenger

ATP, adénosine triphosphate

ATPase, enzyme qui hydrolyse ou synthétise les molécules d'ATP

AV, auriculo-ventriculaire

AVC, accident vasculaire cérébral

BNP, peptide natriurétique de type B (*brain natriuretic peptide*)

BSA, albumine sérique bovine

CCDV, canal calcique dépendant du voltage

CCL2 (ou MCP-1), CC-motif *ligand 2 chemokine* (ou *monocyte chemoattractant protein-1*)

CD36, *cluster of differentiation 36*

CD36^{-/-}, déficient en récepteur CD36

CACT, carnitine-acylcarnitine translocase

CI₅₀, concentration inhibitrice 50

CL, cardiolipine

CLESH-1, *CD36 LIMP II Emp structural homology 1*

CO₂, dioxyde de carbone

CoA, coenzyme A

COX-2, cyclooxygénase-2

CPT-I, carnitine palmitoyl-transférase I

CPT-II, carnitine palmitoyl-transférase II

CRP, protéine C réactive

Cyt c, cytochrome c

DAVD, dysplasie arythmogène du ventricule droit

DC, débit cardiaque (*cardiac output*)

DMSO, diméthylsulfoxyde

DNP, peptide natriurétique de type D

dP/dt max (ou min), dérivée première de la courbe de pression en fonction du temps, vitesse maximale d'augmentation (ou de diminution) de pression

Ea, élastance artérielle

ECG, électrocardiogramme

EDTA, acide éthylène diamine tétraacétique

Ero1-L α , oxidoréductase du réticulum endoplasmique-1 α (*endoplasmic reticulum oxidoreductase-1 L alpha*)

ERp44, protéine de 44 kDa du réticulum endoplasmique

FABP, protéine de liaison des acides gras (*fatty-acid-binding protein*)

FABPpm, protéine de liaison des acides gras de la membrane plasmique

FAD, flavine adénine dinucléotide

FADH₂, flavine adénine dinucléotide sous sa forme réduite

FAT, *fatty acid translocase*

FATP, protéine de transport des acides gras

FE, fraction d'éjection

FMN, flavine mononucléotide

Fyn, tyrosine kinase de la famille des Src (sarcome)

GC-A, guanylate cyclase-A

GHRP, peptide de relâche de l'hormone de croissance

GHS-R1a, récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance de type 1a

GLUT1, transporteur de glucose de type 1

GLUT4, transporteur de glucose de type 4

GM-CSF, *granulocyte macrophage-colony-stimulating factor*

GMPc, guanosine monophosphate cyclique

gp91, sous-unité catalytique de la NADPH oxydase

GSH, glutathion

GSHPx, glutathion peroxydase

GTP, guanosine triphosphate

H₂O₂, peroxyde d'hydrogène

Haic, 5-amino-1,2,4,5,6,7- tétrahydro azepino [3,2,1-hi]indol-4-one-2-carboxylate

HC, hormone de croissance

HDL, lipoprotéine de haute densité (*high density lipoprotein*)

HEPES, acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HFHC, diète riche en lipides et en cholestérol (*high fat high cholesterol diet*)

HMW, haut poids moléculaire (*high molecular weight*)

HRP, peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase*)

HSL, lipase hormono-sensible (*hormone-sensitive lipase*)

IA, zone infarctie (*infarct area*)

IL-4, interleukine-4

IL-8, interleukine-8

iNOS, oxyde nitrique synthase inductible (*inducible nitric oxide synthase*)

i.p., intra-péritonéale

I/R, ischémie-reperfusion

JNK1, *c-Jun N-terminal kinase 1*

JNK2, *c-Jun N-terminal kinase 2*

kDa, kilodalton

KHB, Krebs-Henseleit bicarbonate

K-MES, *2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid potassium salt*

LDH, lactate déshydrogénase

LDL, lipoprotéine de basse densité

LDLox, lipoprotéine de basse densité oxydée

LKB1, kinase hépatique B1 (*liver kinase B1*)

LMW, faible poids moléculaire (*low molecular weight*)

LPS, lipopolysaccharide

MAPK, *mitogen-activated protein kinase*

M-CSF, *macrophage colony stimulating factor*

MI/R, ischémie-reperfusion du myocarde (*myocardial ischemia/reperfusion*)

MnSOD, superoxyde dismutase à manganèse

MOPS, 3-[N-morpholino] propanesulfonique

MP, microparticule

MPC, *mitochondrial pyruvate carrier*

mPTP, pore de transition de perméabilité mitochondrial

NAD⁺, nicotinamide adénine dinucléotide

NADH, nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme réduite

NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

Nav, canal Na^+ voltage-dépendant

NCX_{RM} , *sodium–calcium exchanger operating in reverse mode*

NF κ b, facteur nucléaire kappa B (*nuclear factor kappa B*)

NHE-1, *sodium–hydrogen exchanger*

NO, oxyde nitrique (*nitric oxide*)

NOS, espèces réactives de l'azote

O_2 , dioxygène

$\text{O}_2^{\bullet-}$, anion superoxyde

oxPC $_{\text{CD36}}$, phosphatidylcholine oxydée liant le CD36

oxPS, phosphatidylsérine oxydée

p38, une MAPK

pb, paire de bases

PBS, tampon phosphate salin

PC, phosphatidylcholine

PDE, phosphodiesterase

PDGF, facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor*)

PDH, pyruvate déshydrogénase

PE, phosphatidyléthanolamine

Pes, pression en fin de systole (*end systolic pressure*)

PGE2, prostaglandine E2

Pi, phosphate inorganique

PKG, protéine kinase dépendante du GMPc

PN, peptide natriurétique

PPAR- α , *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*

PPAR- γ , *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*

PPi, pyrophosphate

Pro, proline

PRSW, réserve de travail systolique (*preload recruitable stroke work*)

PS, phosphatidylsérine

Q_o, ubiquinone o

Q_i, ubiquinone i

RE, réticulum endoplasmique

ROS, espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*)

RPN, récepteurs peptidiques natriurétiques

RPP, produit de la pression développée et de la fréquence cardiaque (*rate pressure product*)

RPT, résistance périphérique totale

SA, sino-auriculaire

Ser, sérine

SHR, rat spontanément hypertendu (*spontaneously hypertensive rat*)

SPHK1, kinase sphingosine 1

SRA1, *scavenger receptor A1*

SSO, sulfo-N-succinimidyl oléate

SSP, sulfo-N-succinimidyl palmitate

Src, protéine tyrosine kinase codée par un gène src (sarcome)

TCF, fraction cytosolique totale

μ TEP, tomographie par émission de positrons

TG, triglycérides

TLR, récepteur de type Toll

TM, domaine transmembranaire

TMB, tétraméthylbenzidine

TNF α , facteur de nécrose tumorale α

TnIc, troponine I cardiaque

Tris, 2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol

TSP1, thrombospondine-1

TSR, motif répétitif de la thrombospondine de type 1

TTC, chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium

Tyr, tyrosine

UA, unité arbitraire

UCP2, protéine de découplage 2

UFR, unité de fluorescence relative

Vav, facteur d'échange des nucléotides guanyliques

VCAM-1, *vascular cell adhesion protein 1*

VD, ventricule droit

VES, volume d'éjection systolique

VG, ventricule gauche

VLDL, *very-low-density lipoprotein*

WT, type sauvage

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier Dre Véronique Michaud et Dr. Denis DeBlois. Merci d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

J'aimerais remercier mes directeurs de recherche, Dre Sylvie Marleau et Dr. Huy Ong, qui m'ont guidé et appuyé tout au long de ma maîtrise. Merci à Dr. Ong pour m'avoir donné des conseils très utiles et toujours poussée à réfléchir sur le «comment? et pourquoi?» de mes résultats. Vous m'avez montré que la recherche n'est pas seulement des faire des expériences et des manipulations au laboratoire, mais aussi de faire beaucoup de lecture d'articles et d'analyse.

Sylvie, je vous remercie infiniment de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir encadrée dans ma maîtrise. J'ai énormément apprécié votre dévouement et votre passion pour la recherche qui est vraiment contagieuse. L'ambiance au laboratoire et les liens unissant tous les membres de l'équipe sont très importants, à l'intérieur et en dehors du laboratoire, grâce à votre gentillesse et votre amour de la vie qui a permis de former, on pourrait dire, une grande famille. Je n'oublierai jamais la patience dont vous avez fait preuve avec moi lors de mes pratiques d'orale et les trucs que vous m'avez donnés afin de combattre ma timidité et de me permettre de développer ma confiance en moi. Je suis reconnaissante de tout, beaucoup plus que vous ne pouvez l'imaginer.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire. Merci à Valérie pour m'avoir montré la chirurgie sur les souris, sans toi je n'aurais sûrement pas eu ce sujet de maîtrise. Merci à David de m'avoir toujours appuyée et encouragée lors de mes expériences au laboratoire et de m'avoir toujours corrigée et aidée lorsque je faisais mes innombrables gaffes. Merci à Cindy, Catherine et Ann pour m'avoir enseigné énormément de choses sur les

techniques des animaux. Merci à Dilan, le «Chuck Norris» du labo, comme nous nous amusons à l'appeler, qui a les réponses à toutes les questions. Merci aussi à Katia, Petra, Christian et Simon.

Je remercie mes parents et mes sœurs pour leur support et pour l'amour qu'ils m'ont donné tout au long de ma vie. Je leur suis extrêmement reconnaissante de m'avoir appuyé tout au long de mes études et de m'avoir encouragée lors des moments difficiles.

Je voudrais aussi remercier un être cher qui m'a quittée, mais qui a beaucoup influencé ma vie : mon grand-père, Mr Marcel Chenail.

Je dédie ce mémoire

à ma mère, mon père, mes sœurs

et à Sylvie

1. INTRODUCTION

1.1. Les maladies cardiovasculaires

De nos jours, dans les pays industrialisés comme le Canada, les maladies cardiovasculaires font partie des principales préoccupations du système de santé publique puisqu'elles demeurent l'une des premières causes de morbidité et mortalité de la population (Jaswal *et al.*, 2011). En effet, malgré les avancées technologiques et thérapeutiques existantes de nos jours, il reste tout de même un gros manque à gagner dans le traitement des maladies cardiovasculaires, puisque ces dernières et le diabète causent, chaque année, environ 17 millions de décès dans le monde (Singh *et al.*, 2013), et sont responsables de 16,9 % de toutes les hospitalisations (Agence de la santé publique du Canada, 2009).

De nombreux facteurs de risque sont associés aux maladies cardiovasculaires et aux accidents vasculaires cérébraux (AVC). Il est possible de modifier certains de ces facteurs, mais d'autres sont incontrôlables. L'âge, le sexe et la race d'un individu peuvent affecter son niveau de risque de développer une maladie cardiovasculaire (Agence de la santé publique du Canada, 2009). En effet, les hommes sont plus à risque d'avoir une crise cardiaque que les femmes, et les événements surviennent plus tôt dans leur vie. De plus, les taux d'hospitalisation pour des cardiopathies ischémiques sont beaucoup plus élevés chez les hommes que chez les femmes de tous les groupes d'âge, et les taux, autant chez les hommes que chez les femmes, augmentent régulièrement en fonction de l'âge (Agence de la santé publique du Canada, 2009). L'âge est également un élément important puisque plus de 83% des personnes qui meurent de maladies coronariennes sont âgées de 65 ans ou plus (American Heart Association, 2012). L'historique familial, en ce qui a trait aux maladies cardiovasculaires, joue également un rôle dans le risque de développer ces maladies chez un

individu. Le tabagisme, l'alcool, la sédentarité, l'obésité, l'hypertension artérielle, l'hypercholestérolémie et le diabète sont, quant à eux, les principaux facteurs modifiables pouvant mener aux maladies cardiovasculaires (Fondation des maladies du cœur et de l'AVC, 2012; Go *et al.*, 2013; Goff *et al.*, 2013). En accord avec ces observations, environ les trois quarts des personnes atteintes du diabète meurent d'une forme de maladie cardiovasculaire (American Heart Association, 2012).

1.1.1. Les statistiques

En 2009, les maladies du cœur représentaient 31 % de l'ensemble de tous les décès survenus au Canada. Autrement dit, cela signifie qu'une personne meurt d'une maladie cardiovasculaire à toutes les 7 minutes (Statistiques Canada, 2011). En 2008, parmi tous les décès dus à des problèmes cardiovasculaires, 54% de ces derniers étaient attribuables aux maladies cardiovasculaires ischémiques, 20% aux AVC et 23% aux crises cardiaques (Statistiques Canada, 2011). Si on prend en considération l'Amérique du Nord dans son ensemble, les maladies cardiaques ischémiques coûtent, en considérant les frais directs et indirects, plus de 440 milliards de dollars (Rosamond *et al.*, 2008; Lloyd-Jones *et al.*, 2009).

En conséquence, la recherche pour le diagnostic précoce et/ou de nouvelles avenues thérapeutiques demeurent primordiales afin d'atténuer ce problème.

1.1.2. Les différents types de maladies cardiovasculaires

Les cardiomyopathies peuvent être divisées en deux catégories selon la restriction circulatoire qu'elles occasionnent. Il y a les cardiomyopathies non ischémiques et les cardiomyopathies ischémiques.

1.1.2.1. Les maladies cardiovasculaires non-ischémiques

Les maladies cardiovasculaires non-ischémiques sont réparties en 4 sous-groupes : les cardiomyopathies dilatées, restrictives, hypertrophiques et arythmogènes (Komajda et Charron, 2002). Ces maladies, surtout les maladies restrictives, causent de l'insuffisance. Dans la cardiopathie dilatée, l'insuffisance cardiaque est surtout d'origine systolique. Par contre, pour les maladies restrictives et hypertrophiques, la cause de l'insuffisance est surtout d'ordre diastolique (Komajda et Charron, 2002).

Ainsi, les cardiomyopathies dilatées sont caractérisées par l'élargissement du ventricule gauche (VG) entraînant un dysfonctionnement systolique avec une fraction d'éjection diminuée de moitié (Hershberger *et al.*, 2010). La dilatation de la cavité du VG peut également être accompagnée de la dilatation des oreillettes et/ou du VD (Hershberger *et al.*, 2010). Les cardiomyopathies dilatées sont la principale cause de transplantation cardiaque aux États-Unis (Marleau *et al.*, 2006). Ces maladies sont associées à de nombreux défauts génétiques dans les gènes codant pour diverses protéines, dont celles du cytosquelette (dystrophine, desmine), des sarcomères (actine, troponine T) et/ou de la membrane cellulaire et nucléaire des cellules (Marleau *et al.*, 2006). Les cardiomyopathies restrictives, quant à elles, sont caractérisées par

une hypertrophie moyenne du VG. Dans cette situation, le cœur doit produire une pression élevée en fin de diastole afin d'obtenir un volume normal en fin de diastole du VG (Hershberger *et al.*, 2010).

Tableau 1.1. Caractéristiques des maladies ischémiques et non-ischémiques
(Hullin *et al.*, 2003; Hershberger *et al.*, 2010)

Types de cardiomyopathie	Caractéristiques
Non-ischémique	
Dilatée	<ul style="list-style-type: none"> ○ Dilatation du VG ○ Dysfonctionnement systolique
Restrictive	<ul style="list-style-type: none"> ○ Légère hypertrophie du VG ○ Fonction systolique normale à légèrement diminuée
Hypertrophique	<ul style="list-style-type: none"> ○ Hypertrophie du VG ○ Pas de dilatation ○ Hypercontractilité
Arythmogène	<ul style="list-style-type: none"> ○ Dégénérescence du VD en tissus conjonctif et adipeux
Ischémique	
	<ul style="list-style-type: none"> ○ Dysfonction ventriculaire ○ Arythmie ventriculaire ○ Obstruction de vaisseaux

VG, ventricule gauche; VD, ventricule droit.

Pour ce qui est du troisième type de cardiomyopathie non-ischémique, dite hypertrophique, on observe un épaississement des parois du VG sans qu'il y ait toutefois dilatation de la cavité du ventricule. Cela peut alors occasionner une hypercontractilité engendrant une fraction d'éjection supérieure à la normale ($> 80\%$) (Hershberger *et al.*, 2010). La prévalence de cette pathologie est de 1 : 500 chez les jeunes adultes (Hullin *et al.*, 2003).

Les maladies arythmogènes sont des maladies cardiovasculaires non-ischémiques qui atteignent principalement le VD. Elles sont la principale cause de mort subite chez les jeunes

puisqu'elles ne provoquent aucun symptôme apparent. (Fondation des maladies du cœur et de l'AVC, 2011). La dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) est une des maladies arythmogènes dont la prévalence est de 1:1000 à 1:5000 (Basso *et al.*, 1999). Il s'agit de la première cause de mort subite en Italie (Corrado *et al.*, 2006). Les maladies arythmogènes sont caractérisées par une dégénérescence progressive du myocarde du VD en tissu conjonctif et adipeux qui gêne le rythme normal des battements du cœur (Hullin *et al.*, 2003). Les maladies arythmogènes sont souvent causées par des mutations génétiques. Dans environ 30% des cas, il y a des antécédents familiaux avec la plupart du temps un mode de transmission héréditaire de type autosomique dominant (Hullin *et al.*, 2003).

1.1.2.2. Les maladies cardiovasculaires ischémiques

Les maladies cardiovasculaires ischémiques sont des altérations cardiaques qui surviennent lorsque l'apport en oxygène par la circulation sanguine est inférieur à la quantité nécessaire pour répondre aux besoins fonctionnels du cœur et par conséquent, de l'organisme. Le principal symptôme de l'ischémie cardiaque chez l'homme est l'angine de poitrine, c'est-à-dire une oppression douloureuse dans la région du cœur qui est fluctuante selon l'effort et le repos (Vigue et Martin, 2006). Il y a plusieurs causes qui peuvent entraîner une obstruction des vaisseaux et ainsi un arrêt de la circulation en aval de l'occlusion, incluant les spasmes artériels, les embolies et l'hypertrophie myocardique, pouvant conduire à l'ischémie du myocarde. Toutefois, la pathologie sous-jacente la plus fréquente est l'athérosclérose des artères coronaires.

Plusieurs biomarqueurs peuvent être utilisés pour diagnostiquer les maladies des artères coronaires avant qu'elles ne surviennent ou en cours de développement. Les niveaux de *brain natriuretic peptide* (BNP), de protéine C réactive (CRP), d'homocystéine, de rénine et le ratio urinaire d'albumine/créatinine en sont quelques-exemples (Boudi et Ahsan, 2013). Par exemple, un niveau élevé de CRP est considéré comme un facteur de risque puisqu'il est lié à la présence d'une inflammation qui est associée à un risque accru de développement de maladies coronariennes et de crises cardiaques (Boudi et Ahsan, 2013).

1.2. Les fonctions cardiaques

1.2.1. La pompe cardiaque

La fonction première et primordiale du cœur est le pompage du sang dans tout l'organisme. Le sang doit traverser les poumons pour pouvoir se décharger de son CO₂ en évacuent ces énormes quantités, tandis que le sang sortant des poumons, riche en O₂ se dirige vers l'oreillette gauche, puis le ventricule gauche, pour ensuite être transporté à tout le corps. En plus de permettre la distribution de l'O₂, la circulation sanguine permet de fournir aux tissus les nutriments absorbés par le tractus-intestinal, de distribuer les hormones et les différents substrats aux tissus, d'apporter les produits/déchets du métabolisme aux reins et/ou au foie et également de réguler la température corporelle (Ganong *et al.*, 2012).

1.2.1.1. Le système de conduction cardiaque

Pour que le cœur se contracte, il faut qu'il y ait dépolarisation et repolarisation des fibres musculaires du myocarde. Ces événements peuvent se produire grâce au système de conduction que possède le cœur et qui est constitué du nœud sino-auriculaire (SA), des tractus auriculaires internodaux, du nœud auriculo-ventriculaire (AV), du faisceau de His et du réseau de Purkinje. La dépolarisation du nœud SA, le premier élément de la conduction, se propage aux autres régions et détermine le rythme cardiaque. La dépolarisation va donc du nœud SA jusqu'au nœud AV en passant par les tractus auriculaires internodaux. Rendue au nœud AV, la dépolarisation va continuer son chemin en se propageant dans le faisceau de His jusqu'à ce qu'elle emprunte le réseau de Purkinje pour aller dans le muscle ventriculaire (Ganong *et al.*, 2012).

La dépolarisation du nœud SA survient lorsque les canaux Na^+ dépendants du potentiel, ou voltage-dépendants (Nav), s'ouvrent. L'ouverture des canaux se produit en chaîne sur la fibre musculaire jusqu'aux disques intercalaires et aux jonctions communicantes pour être transmis à la fibre suivante. À la suite de la dépolarisation, qui a été très rapide, la repolarisation, initialement rapide, s'effectue par la fermeture des canaux Na^+ et l'ouverture des canaux K^+ , suivie de l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (CCDV). Le potentiel membranaire au repos, qui est de -80 mV , est obtenu par la fermeture des canaux Ca^{2+} et par la sortie du K^+ qui se fait lentement (Ganong *et al.*, 2012).

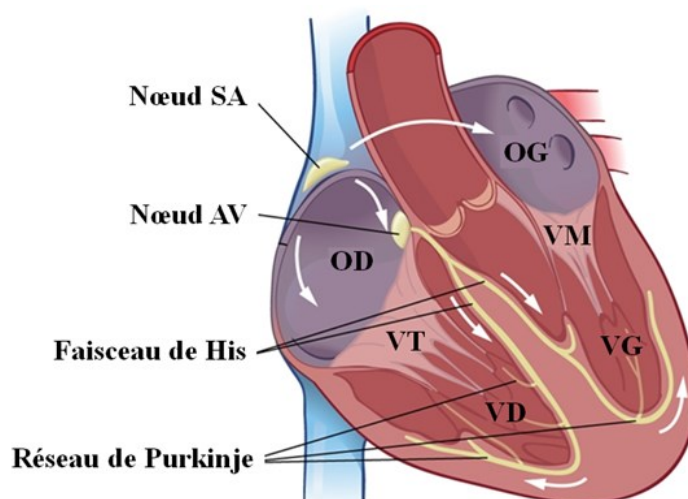


Figure 1.1 Le système de conduction du cœur menant à la contraction. Les flèches blanches représentent la direction de la propagation de la dépolarisation menant à la contraction. AV, nœud auriculo-ventriculaire; OD, oreillette droite; OG, oreillette gauche; SA, nœud sino-auriculaire; VD, ventricule droit; VG, ventricule gauche; VM, valve mitrale; VT, valve tricuspide. (Figure modifiée et traduite de Munshi *et al.*, 2009).

1.2.1.2. La contraction

Le cœur se remplit de sang au cours de la diastole, période durant laquelle les quatre cavités du cœur se relâchent. Les valves mitrales (bicuspidés) et tricuspides sont donc ouvertes, permettant l'écoulement du sang des oreillettes aux ventricules. Les ventricules se remplissent à environ 70% de leur capacité. Par la suite, la systole auriculaire, c'est-à-dire la contraction des oreillettes, permet de remplir davantage les ventricules. L'augmentation de la quantité de sang présente dans les ventricules fait augmenter la pression dans ceux-ci et lorsque la pression ventriculaire devient plus importante que la pression auriculaire, il y a

fermeture des valves mitrale et tricuspide et ouverture des valves aortique et pulmonaire des ventricules gauche et droit, respectivement. Le volume éjecté à la fin de la systole représente environ 65% du volume ventriculaire en fin de diastole, il s'agit de la fraction d'éjection. Lorsque l'expulsion du sang des ventricules est terminée, les valves aortique et pulmonaire se referment et la pression dans les ventricules devient inférieure à la pression dans les oreillettes. C'est à ce moment que les valves mitrale et tricuspide s'ouvrent pour permettre de nouveau le remplissage des ventricules (Ganong et *al.*, 2012).

1.2.1.3. La circulation

Le sang veineux provenant de l'organisme arrive au cœur au niveau de l'oreillette droite par les veines cave inférieure et supérieure. Le sang est ensuite déversé dans le VD, et propulsé vers les poumons lors de la contraction du ventricule en empruntant le tronc pulmonaire et les artères pulmonaires. Le sang, nouvellement chargé en O₂, est transporté des poumons jusqu'à l'oreillette gauche par les veines pulmonaires pour être ensuite déversé dans le VG où il est envoyé dans l'aorte, puis, de là, dans tout l'organisme.

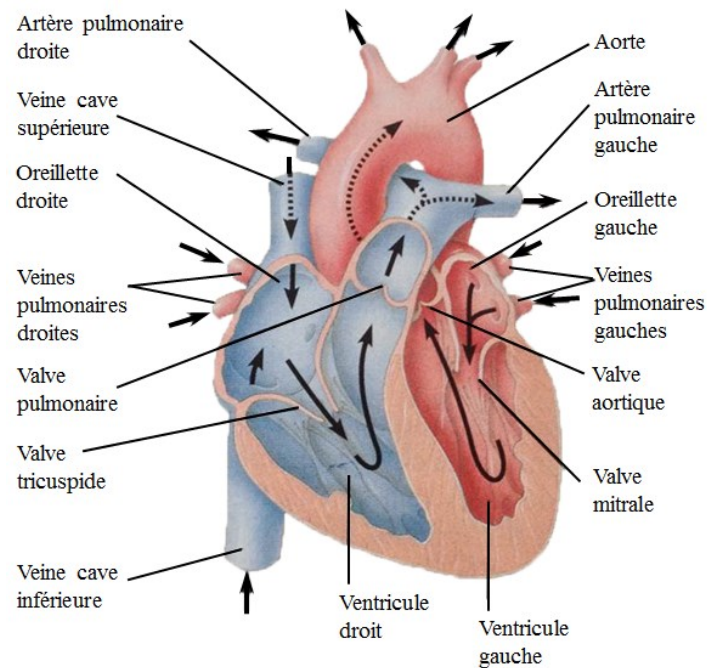


Figure 1.2 Structure du cœur. Les flèches noires représentent la direction de la circulation sanguine dans le cœur. (Figure modifiée de Campbell et Reece, 2007)

1.2.2. La sécrétion d'hormones

1.2.2.1. Les peptides natriurétiques

Lorsque l'on parle de la fonction hormonale du cœur, on pense tout d'abord, et principalement, à la sécrétion des peptides natriurétiques. En effet, le cœur synthétise et relâche dans la circulation le peptide natriurétique auriculaire (ANP) et le peptide natriurétique

de type B (*brain natriuretic peptide*, BNP) constitués de 28 et 32 acides aminés, respectivement (Bettencourt, 2002 ; Saito, 2010).

L'ANP et le BNP possèdent des propriétés diurétique, natriurétique, vasodilatatrices, anti-mitogénique, d'inhibition de la rénine et de l'aldostérone ainsi qu'une activité lusitrope, c'est-à-dire qu'ils induisent la relaxation et le retour à la position de repos des cellules musculaires cardiaques (Bettencourt, 2002).

La synthèse et la relâche de ces peptides surviennent lorsqu'il y a une augmentation du volume ou de la pression cardiaque ainsi qu'en présence de facteurs humoraux, que ce soit localement ou en circulation. Donc, des concentrations élevées de ces peptides natriurétiques dans la circulation sont des marqueurs biologiques d'une insuffisance cardiaque (Bettencourt, 2002). De plus, de nombreuses études ont démontré que l'expression, ainsi que les concentrations plasmatiques de l'ANP, et particulièrement de BNP, sont augmentées lors d'un infarctus du myocarde. Ceux-ci augmentent rapidement lors de la phase aigüe de l'infarctus et redescendent pour augmenter à nouveau dans les 7 jours, puis diminuer progressivement (Saito, 2010).

Il existe trois récepteurs pour les peptides natriurétiques, que l'on nomme les *récepteurs peptidiques natriurétiques* (RPN). Les récepteurs RPN1 et RPN2, sont les récepteurs de l'ANP et du BNP, respectivement. Il s'agit de deux récepteurs membranaires ayant un domaine intracellulaire guanylate cyclase (Lanfear, 2010). Ceux-ci sont présents dans de nombreux tissus du système vasculaire, comme l'endothélium, les muscles lisses et le cœur, mais également dans les reins.

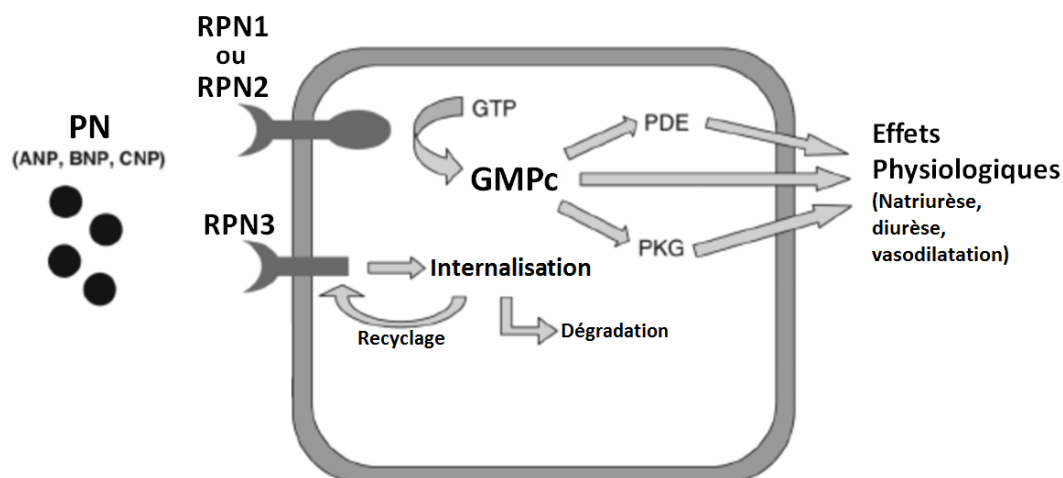


Figure 1.3 Récepteurs et signalisation des peptides natriurétiques. GMPC, guanosine monophosphate cyclique; GTP, guanosine triphosphate; PDE, phosphodiesterase; PKG, protéine kinase dépendante du GMPC; PN, peptides natriurétiques; RPN, récepteur peptidiques natriurétiques. (Figure modifiée de Lanfear, 2010)

La liaison des peptides natriurétiques à leur récepteur entraîne une augmentation de la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPC) qui est le second messenger intracellulaire résultant de l'activation des RPN. Le changement de la concentration de GMPC dans la cellule va activer des protéines kinases dépendantes du niveau de GMPC (PKG) (Molkentin, 2003).

Le troisième RPN, le RPN3, est un récepteur non-catalytique puisqu'il ne possède pas le domaine guanylate cyclase présent dans les RPN1 et 2. Le rôle de ce récepteur est plutôt d'éliminer de la circulation sanguine les peptides natriurétiques. En effet, celui-ci permet l'internalisation et la dégradation des peptides natriurétiques dans les lysosomes (Lanfear, 2010).

1.2.2.2. *L'adiponectine*

En plus de l'ANP et du BNP, le cœur sécrète une autre hormone, l'adiponectine (APN). En effet, il a été démontré récemment que l'APN n'est pas seulement exprimée dans le tissu adipeux, mais également dans les cardiomyocytes (Amin *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010). L'APN est une hormone constituée de 247 acides aminés dont le gène se retrouve sur le chromosome 3q27 (Nanayakkara *et al.*, 2012). Il s'agit d'une hormone qui appartient structurellement à la famille du complément 1q puisque, comme celui-ci, elle est composée d'une région hypervariable à son domaine N-terminal, suivie par un domaine collagène-like consistant en la répétition de 22 glycines (Gly)-X-Y, et d'un domaine globulaire "C1q-like" en C-terminal (Xu et Vanhoutte, 2012). En effet, le domaine collagène-like est une séquence caractéristique des protéines avec triple hélice, semblables aux fibres de collagène (Tsao *et al.*, 2002). L'APN de pleine longueur doit subir des modifications post-traductionnelles, dont de l'hydroxylation et de la glycosylation pour dévoiler son activité (Wang *et al.*, 2002). L'APN plasmatique peut être retrouvée en trois complexes multimériques distincts, soit en trimère (~90 kDa), en hexamère (~180 kDa) ou en une forme de haut poids moléculaire qui se compose de 12 à 18 protomères (~360-400 kDa) (Xu et Vanhoutte, 2012; Goldstein *et al.*, 2009). L'APN est une adipokine circulant dans le plasma à des concentrations relativement élevées (2-17 µg/mL) ayant un rôle insulino-sensibilisant, anti-inflammatoire, anti-athérogénique et cardioprotecteur (Wang *et al.*, 2010 ; Amin *et al.*, 2010 ; Villarreal-Molina et Antuna-Puente, 2012). L'APN représente 0,01 % de la teneur totale en protéines du plasma chez l'homme (Xu et Vanhoutte, 2012) et les niveaux d'APN sériques sont environ deux fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Goldstein *et al.*, 2009).

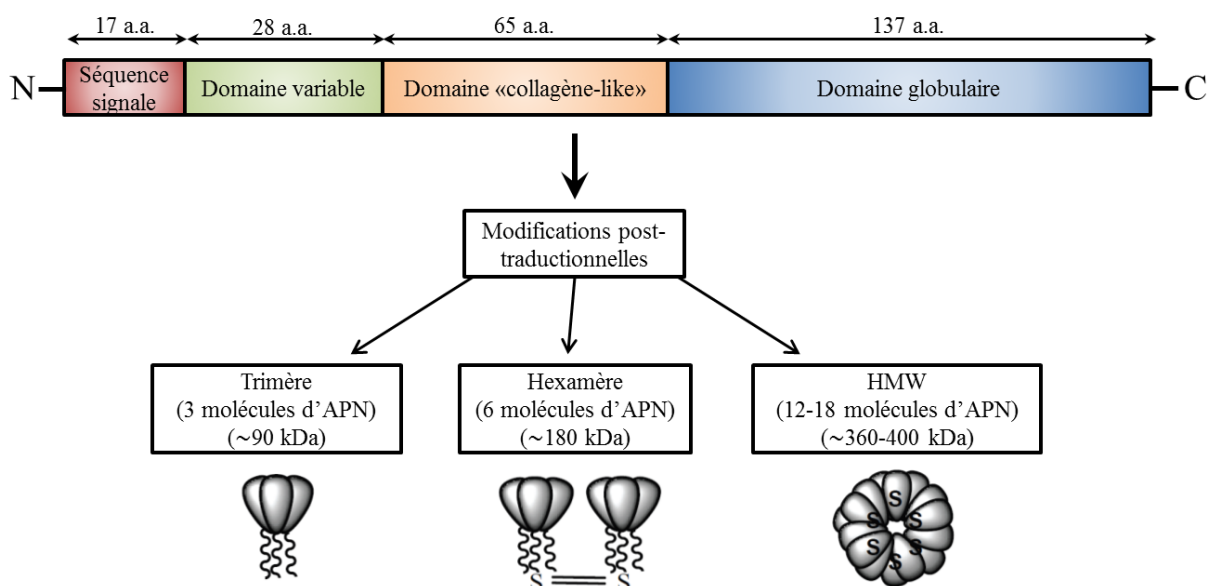


Figure 1.4 Structure de l'adiponectine. L'APN de pleine longueur doit subir des modifications post-traductionnelles pour avoir une activité (i.e. hydroxylation et glycosylation). L'APN est sécrétée sous forme de trimère (~90 kDa, l'unité de base), d'hexamère (~180 kDa) et de haut poids moléculaire (12-18 molécules d'APN; ~400 kDa). a.a., acides aminés; C, extrémité carboxy-terminale; HMW, haut poids moléculaire (*high molecular weight*); N, extrémité amino-terminale. (Figure modifiée et traduite de Nanayakkara *et al.*, 2012; Goldstein *et al.*, 2009).

La sécrétion d'APN est étroitement régulée par des protéines de rétention du réticulum endoplasmique (RE). Il y a la protéine de 44 kDa du RE (ERp44) et la RE oxidoréductine-1 (Ero1- α) (Villarreal-Molina et Antuna-Puente, 2012). La ERp44 forme un pont disulfure avec l'APN, afin de permettre sa maturation en forme LMW (*low molecular weight*) et HMW. La Ero1- α est, quant à elle, impliquée dans la réduction de la liaison disulfure entre l'APN et ERp44, et par conséquent, dans la relâche de l'APN (Villarreal-Molina et Antuna-Puente, 2012).

L'APN produit ses effets par l'entremise de ses récepteurs, les récepteurs 1 et 2 de l'APN (AdipoR1 et AdipoR2, respectivement) qui sont présents dans de nombreux tissus dont les cardiomyocytes. Par contre, leur distribution n'est pas la même puisque l'adipoR1 est plus abondant dans les cellules musculaires et les cardiomyocytes et l'adipoR2 est plus prédominant dans le foie (Lee *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2007). Ces récepteurs de l'APN contiennent 7 passages transmembranaires, mais ceux-ci sont structurellement distincts des récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G. (Goldstein *et al.*, 2009). L'APN lie le domaine extracellulaire C-terminal de l'adipoR1. Le domaine N-terminal de l'adipoR1, cytosolique, permet la liaison du récepteur à une protéine adaptatrice, l'APPL1 (*adaptor protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain and a leucine zipper motif 1*) (Goldstein *et al.*, 2009). L'APPL1 possède de nombreux domaines fonctionnels et est fortement exprimé dans le cœur (Nanayakkara *et al.*, 2012). En plus de ces deux récepteurs, la T-cadhérine est aussi un récepteur de l'APN, plus précisément pour la forme hexamérique et de haut poids moléculaire (Hug *et al.*, 2004). La T-cadhérine est abondamment exprimée dans le myocarde et est associée avec des domaines membranaires riches en cholestérol (appelés radeaux lipidiques) du sarcolemme cardiaque (Denzel *et al.*, 2010). De plus, la T-cadhérine est fortement exprimée dans le système vasculaire, dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les péricytes (Parker-Duffen *et al.*, 2013).

L'activation du *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- γ) dans le muscle squelettique et les cardiomyocytes induit l'expression d'APN qui est sécrétée dans la circulation, mais qui agit aussi de façon paracrine en stimulant l'activité d'AMPK dans les myocytes (Amin *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2007). L'expression de l'APN au niveau des

cardiomyocytes est donc dépendante de PPAR- γ . En effet, l'expression de l'APN induite par PPAR- γ va mener à l'interaction de l'APN avec ses récepteurs et l'APPL1, qui mène à la translocation de la kinase hépatique B1 (LKB1) du noyau vers le cytoplasme et induit également l'ancrage de celui-ci au complexe AdipoR-APPL1 dans les cardiomyocytes (Fang *et al.*, 2010; Nanayakkara *et al.*, 2012). La formation du complexe LKB1-APPL1-AdipoR conduit à l'activation d'AMPK (Nanayakkara *et al.*, 2012). Cela va affecter le métabolisme énergétique dans le cœur par l'augmentation de l'oxydation d'acides gras et de l'internalisation du glucose (Ding *et al.*, 2007). De plus, l'APN produite chez des cardiomyocytes *in vitro* agit de façon autocrine via adipoR1 en réduisant les effets hypertrophiques obtenus à la suite de stimuli adrénergiques (Amin *et al.*, 2010).

Donc, lorsque l'APN se lie à ces récepteurs au niveau des cardiomyocytes, elle peut avoir de nombreux effets par l'intermédiaire de plusieurs voies de signalisation qui vont induire ses effets bénéfiques sur le cœur. En effet, elle peut activer la kinase sphingosine 1 (SPHK1) qui active la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), qui va permettre d'inhiber le facteur de nécrose tumoral (TNF α) qui est pro-inflammatoire (Goldstein *et al.*, 2009; Ikeda *et al.*, 2008). Il a été démontré, par Shibata *et al.*, que c'est la prostaglandine E2 (PGE2), synthétisé par COX-2 qui inhibe le TNF α en présence d'APN. En effet, les cardiomyocytes produisent du TNF α lorsqu'ils sont stimulés avec du lipopolysaccharide (LPS), mais la présence d'APN inhibe cette production. De plus, l'APN stimule la production de PGE2 dans les cardiomyocytes et cette production peut être inhibée par un inhibiteur de COX-2. L'APN engendre donc une augmentation de la production de PGE2 par l'entremise de COX-2 et ainsi inhibe la production de TNF α (Shibata *et al.*, 2005). De plus, l'APN médie la suppression de l'activation de NF- κ B induite par le TNF α et la phosphorylation de l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B-

α), sans affecter les autres signaux de phosphorylation médiés par le $\text{TNF}\alpha$, y compris la kinase Jun N-terminale, la kinase p38, et la kinase Akt (Ouchi *et al.*, 2000). Cet effet inhibiteur de l'APN est accompagné d'une accumulation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et est bloqué par l'inhibiteur soit de l'adénylate cyclase ou de la protéine kinase A (PKA) dans les cellules endothéliales (Ouchi *et al.*, 2000).

Tel que mentionné ci-haut, l'APN peut activer l'AMPK, mais aussi l'Akt qui permet d'augmenter la translocation à la membrane du récepteur CD36, détaillé dans la section 1.3.2.2., et du transporteur de glucose de type 4 (GLUT4), respectivement (Fang *et al.*, 2010). L'APN permet l'augmentation de l'expression du gène et de l'activité de la CPT-1 (carnitine palmitoyl transférase), qui augmente la bêta-oxydation des acides gras à longue chaîne (AGLC) dans les cardiomyocytes grâce à l'activation de l'AMPK qui active la P38 MAPK, ce qui entraîne l'augmentation de l'expression d'ARNm de CPT-1 (Li *et al.*, 2007; Nanayakkara *et al.*, 2012). De plus, la signalisation survenant à la suite de l'activation de l'AMPK par l'APN induit la phosphorylation de l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC), une enzyme importante dans l'oxydation des acides gras (Nanayakkara *et al.*, 2012). En plus de favoriser l'utilisation des acides gras, l'APN stimule également le transport du glucose, non seulement par l'akt, mais aussi par l'activation de la p38 MAPK et de Rab5 (une petite GTPase) par AMPK, menant également à l'augmentation de la translocation à la membrane de GLUT4 (Mao *et al.*, 2006; Villarreal-Molina et Antuna-Puente, 2012). La liaison de l'APN à son récepteur permet également l'inhibition de la caspase 8 en activant des céramidases qui vont mener à la production de sphingosine-1-phosphate qui vont inhiber la caspase 8 et ainsi inhiber l'apoptose (Xu et Vanhoutte, 2012).

De plus, en inhibant la NO-synthase inductible (iNOS) et la sous-unité catalytique de la NADPH oxydase (gp91), l'APN diminue le stress oxydatif. Il a été démontré que l'APN augmente la production de NO par la voie de signalisation AMPK-Akt-eNOS. En effet, l'APN augmente cette production lors de conditions physiologiques et cela contribue aux effets vasodilatateurs et cardioprotecteurs de l'APN. Par contre, en situation pathologique, l'expression de iNOS est stimulée, mais l'APN va inhiber la surproduction de NO qui survient en inhibant iNOS afin de protéger les tissus du stress nitratif pouvant avoir lieu (Tao *et al.*, 2007). Le NO produit par iNOS mène à la production d'espèces réactives toxiques de l'azote et à l'augmentation de l'inflammation qui cause des dommages lors d'une MI/R. L'APN peut donc, selon les circonstances, réguler la production de NO par eNOS et iNOS en stimulant eNOS et en inhibant iNOS (Nanayakkara *et al.*, 2012). Ainsi, cela explique, en partie, ses effets anti-inflammatoires, anti-oxydants, anti-apoptotiques et sur le métabolisme énergétique. En effet, de nombreuses études ont montré qu'une concentration plasmatique élevée d'APN est associée à de plus faibles risques d'infarctus du myocarde chez l'homme (Pischon *et al.*, 2004). De plus, des niveaux bas d'APN sont corrélés à un risque accru de maladies cardiovasculaires chez les personnes obèses et chez les personnes atteintes de diabète et d'hyperglycémie (Zhu *et al.*, 2008). En effet, un niveau élevé d'APN entraîne une amélioration de l'insulinosensitivité, une diminution des risques cardiovasculaires et une réduction de différents paramètres associés au syndrome métabolique. L'APN contribue activement à l'amélioration du métabolisme (Shoba *et al.*, 2009). Un niveau bas d'APN augmente donc le risque de maladies cardiovasculaires chez les obèses et les diabétiques (Ouchi *et al.*, 2003). Toutefois, il peut y avoir des circonstances pour lesquelles le niveau d'APN est élevé dans un état pathologique, mais il est difficile de savoir si le niveau d'APN élevé est causé ou

augmenté en réponse à la pathologie de façon compensatoire (Shoba *et al.*, 2009). Il a également été démontré que lors d'une ischémie-reperfusion (I/R) simulée chez des cardiomyocytes isolés, les dommages induits sont considérablement potentialisés chez les cellules dépourvues d'APN (Wang *et al.*, 2010).

1.2.3. Le métabolisme énergétique cardiaque

Le transport en continu de substrats tels que les acides gras, le glucose et le lactate dans les cardiomyocytes est un élément clé du métabolisme énergétique cardiaque. La disponibilité de ces substrats est l'un des principaux facteurs déterminant la préférence du cœur pour l'un de ces substrats dans une situation donnée (Schwenk *et al.*, 2008).

En condition physiologique normale, cette production d'énergie est presque entièrement produite (par plus de 95%), par la phosphorylation oxydative mitochondriale (Nagendran *et al.*, 2013; Lopaschuk *et al.*, 2010). L'énergie est produite sous forme d'ATP, le carburant dont se servent les cellules pour combler leurs besoins métaboliques. L'oxydation des acides gras est responsable de la génération de 50 à 70% de l'ATP dans le cœur adulte normal, tandis que seulement 20 à 30% de l'énergie fournie est dérivée de glucose et moins de 5% d'autres sources (Nagendran *et al.*, 2013). L'ATP est constituée d'un ribose auquel est lié une adénine et une chaîne de trois groupements phosphate. L'énergie contenue dans l'ATP provient des phosphates qui y sont liés. L'hydrolyse des liaisons entre les groupements phosphate par une ATPase, va engendrer une molécule de phosphate inorganique et une adénosine diphosphate (ADP) et va libérer de l'énergie qui va être utilisée par la cellule selon

ses besoins (Kang et Peviaz, 2012). Le cœur contient une quantité relativement faible d'ATP, mais l'hydrolyse très rapidement, donc le renouvellement de l'ATP myocardique est très rapide, environ toutes les 10 secondes (Lopaschuk *et al.*, 2010; Jaswal *et al.*, 2011).

1.2.3.1. L'utilisation des acides gras comme source d'énergie

Dans les cellules myocardiques, en condition physiologique normale, c'est-à-dire lorsqu'il y a un apport suffisant en oxygène et en substrats, les cellules utilisent principalement les acides gras pour produire leur ATP par les mitochondries (Schwenk *et al.*, 2008). Puisque le cœur emmagasine de faibles quantités d'acides gras, une internalisation constante provenant de la circulation est nécessaire (Glatz *et al.*, 2013). Les AGLC convertis en acyl-CoA peuvent être estérifiés et stockés dans des gouttelettes lipidiques ou être transportés dans les mitochondries où ils sont utilisés pour produire de l'énergie (Schwenk *et al.*, 2008). Les acides gras exogènes absorbés par l'organisme sont transportés au cœur sous forme de TG ou d'AGNE. Les TG, provenant de notre alimentation, sont hydrolysés par des lipases en acides monoacylglycérol et acides gras par les entérocytes de l'intestin. Les acides gras sont alors réestérifiés en TG et incorporés dans les chylomicrons qui sont sécrétés dans la circulation (Glatz *et al.*, 2010). Les TG sont alors acheminés au cœur en étant contenu dans des chylomicrons. Les acides gras endogènes synthétisés *de novo* par le foie ou captés de la circulation par celui-ci, quant à eux, sont sécrétés en lipoprotéines de très faible densité (*very-low-density lipoproteins*, VLDL) (Lopaschuk *et al.*, 2010). Les chylomicrons, portant les

lipides exogènes, et les VLDL, portant les lipides endogènes, vont être hydrolysés de leur TG par une lipoprotéine lipase à la surface des capillaires pour que les acides gras puissent être acheminés dans les tissus périphériques (Glatz *et al.*, 2010).

Le transport des acides gras jusqu'à l'intérieur des cellules, à travers la membrane des cardiomyocytes, peut se faire de façon passive, par diffusion, puisqu'il s'agit de molécules hydrophobes pouvant traverser la bicouche lipidique des membranes plasmiques. Ils peuvent également le faire à l'aide de transporteurs (FATP, protéine de transport d'acides gras), et de translocases et facilitateur de transport des acides gras (récepteur CD36). Une fois internalisés dans le cytoplasme des cellules, les acides gras sont transportés par les protéines de liaison des acides gras (FABP) et sont estérifiés en acyl-CoA à longue chaîne par l'acyl-CoA synthétase présente sur la membrane externe des mitochondries (Lopaschuk *et al.*, 2010). Les FABP, possédant un ou deux site de liaisons pour les acides gras, sont très abondants dans le cytoplasme des cellules permettant ainsi de lier jusqu'à 150-300 mM d'acides gras (Schwenk *et al.*, 2010).

1.2.3.2. L'utilisation des glucides comme source d'énergie

En présence d'oxygène, la glycolyse va permettre la production d'une petite quantité d'énergie, mais cela va tout de même jouer un rôle important en apportant des substrats pour le métabolisme oxydatif (Katz, 2011). Comme nous l'avons vu précédemment, 20 à 30% de l'ATP produit provient du glucose. Le glucose, puisqu'il est hydrophile, ne peut pas passer la membrane plasmique par diffusion. Il est donc transporté à travers la membrane selon son gradient de concentration par des protéines de transport du glucose, GLUT1 et GLUT4

(Schwenk *et al.*, 2008). À l'intérieur de la cellule, le glucose est rapidement converti en glucose-6-phosphate qui va être soit stocké sous forme de glycogène, soit oxydé par la voie glycolytique (Schwenk *et al.*, 2008). L'ajout de ce phosphate permet, grâce à sa charge négative, l'emprisonnement du glucose dans la cellule (Campbell et Reece, 2007). La voie glycolytique va amener, par l'action de plusieurs enzymes, à la transformation du glucose initial en deux molécules de pyruvate. Au cours de ce processus, des déshydrogénases vont retirer des hydrogènes des molécules. Ceux-ci vont être captés par des NAD^+ , des formes oxydées du nicotinamide adénine dinucléotide, accepteur d'électrons, pour produire des NADH et des protons. Par la suite, le pyruvate va entrer dans les mitochondries pour être converti en acétyl-CoA par la PDH et l'acétyl-CoA va être oxydé en CO_2 par le cycle de l'acide citrique comportant 8 étapes (figure 1.7) et va mener à la production d'ATP dans la mitochondrie grâce à la chaîne de transport des électrons de la membrane interne des mitochondries (Campbell et Reece, 2007). Un acide gras de 16 carbones permet d'obtenir 130 ATP. Le glucose, quant à lui, en présence d'oxygène, permet un bilan maximal de 38 ATP grâce à sa glycolyse, sa conversion en acétyl-CoA et son passage par le cycle de Krebs (Campbell et Reece, 2007).

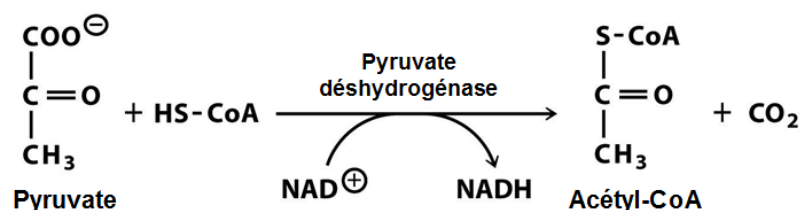


Figure 1.5 Formation de l'acétyl-CoA à partir du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase.
(Figure modifiée et traduite de Horton *et al.*, 2006)

Par contre, en situation anaérobique, la glycolyse ne peut fournir qu'une quantité limitée d'ATP, mais cela n'est pas suffisant pour permettre une activité soutenue par le cœur (Katz, 2011). Dans cette situation, le pyruvate obtenu lors de la transformation du glucose va servir d'accepteur d'électrons pour l'oxydation du NADH, H^+ en NAD^+ et former ainsi le lactate (Campbell et Reece, 2007).

1.2.4. La maladie cardiaque ischémique

1.2.4.1. L'ischémie-reperfusion du myocarde (MI/R)

L'ischémie-reperfusion du myocarde consiste en l'obstruction temporaire d'un vaisseau sanguin irriguant le cœur bloquant ainsi momentanément la circulation sanguine dans une zone plus ou moins grande du cœur. Conséquemment, l'apport en nutriments et en oxygène dans la zone affectée s'en trouvent diminués.

1.2.4.2. L'ischémie

L'obstruction des artères entraîne l'ischémie myocardique qui survient lorsque la quantité d'oxygène disponible pour le cœur ou une portion du cœur n'est pas suffisante pour lui fournir l'oxygène qui lui est normalement requis. Le cœur n'a donc plus de source d'oxygène qui lui permet d'effectuer tout son travail. Toutefois, lorsqu'il y a arrêt complet de l'apport sanguin à la zone ischémique, il n'y a pas seulement un arrêt de l'apport en oxygène

mais également en substrats, les acides gras, dans cette zone. L'interruption de l'apport en acides gras a pour conséquence une réduction du métabolisme des acides gras au niveau du cœur entraînant du même coup une diminution rapide de la production d'ATP. De plus, l'oxydation des acides gras étant inhibée dans les zones ischémiques, due à l'absence d'oxygène, conduit à l'accumulation de dérivés de CoA à longue chaîne (acyl-CoA) et à l'augmentation de triglycérides (TG) dans les cellules, dont les cardiomyocytes (Sharma *et al.*, 2004; Neely et Morgan, 1974). Les TG sont emmagasinés dans les cardiomyocytes dans des gouttelettes lipidiques constituées d'une monocouche de phospholipides permettant d'isoler les éléments hydrophobes du cytoplasme (Aon *et al.*, 2014). Les gouttelettes lipidiques peuvent être intercalées entre des mitochondries ou entourer celles-ci et lorsque les mitochondries et les gouttelettes lipidiques interagissent cela peut mener à l'utilisation des acides gras stockés dans les gouttelettes par la mitochondrie pour produire de l'ATP (Aon *et al.*, 2014). La surexpression de Plin5 (périlipine 5) dans les cardiomyocytes entraîne une augmentation de la proximité et du contact entre les gouttelettes lipidiques et les mitochondries et mène à l'augmentation de la taille des mitochondries sans toutefois en affecter leur nombre (Wang *et al.*, 2013).

De plus, lors de l'ischémie, il y a également une augmentation rapide de la libération de catécholamines favorisant la lipolyse du tissu adipeux et entraînant ainsi une augmentation de la concentration des acides gras circulants (Lopaschuk *et al.*, 2010; Mueller et Ayres, 1980). Cette grande concentration, lors de la reperfusion, devient alors disponible de façon importante au site de l'ischémie.

Donc, se retrouvant en situation anaérobie, le myocarde s'adapte pour survivre et utilise de façon beaucoup plus importante que la normale le glucose à la place des AGNE pour produire son ATP (Jaswal *et al.*, 2011). Le glucose est alors dégradé en acide pyruvique et par la suite en acide lactique puisqu'il ne subira pas l'oxydation dans les mitochondries en absence d'oxygène. Le lactate va être transporté dans le sang à la suite de l'ischémie lors de la reperfusion, c'est-à-dire lorsqu'il y aura recirculation sanguine dans la zone ischémique. Le lactate ainsi que les protons produits vont s'accumuler dans la zone myocardique ischémique et causeront des dommages en perturbant l'homéostasie ionique (Poortmans et Boisseau, 2009; Lopaschuk *et al.*, 2010). En fait, l'homéostasie ionique du cœur est très importante et dépend principalement des échangeurs d'ions ATP-dépendants, la Na^+/K^+ -ATPase et la Ca^{2+} -ATPase et des échangeurs ATP-indépendants comme la $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et le Na^+/H^+ . Lors de l'ischémie, la production de H^+ est accélérée dans la cellule puisque la glycolyse, en situation anaérobie, conduit à la génération de 2 moles d' H^+ par mole de glucose. Comme ces H^+ ne peuvent être utilisés dans la chaîne de transport des électrons dû à la diminution de la disponibilité de l' O_2 , ils s'accumulent et activent l'échangeur Na^+/H^+ (NHE-1). L'activation de NHE-1 conduit à l'accumulation intracellulaire de Na^+ qui, à son tour, conduit à une accumulation de Ca^{2+} par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ fonctionnant en mode inverse (NCX_{RM}) (Clanachan, 2006).

1.2.4.3. La reperfusion

Dans les cardiomyocytes reperfusés à la suite de l'ischémie, il y a une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ , Cl^- , et Ca^{2+} ainsi qu'une baisse de K^+ (Raedschelders *et*

al., 2012). L'accumulation du Ca^{2+} intracellulaire lors de la reperfusion provoque une série d'évènements délétères, notamment des contractures, une augmentation du dysfonctionnement mitochondrial, l'activation de protéases Ca^{2+} -dépendantes, et finalement la nécrose des cardiomyocytes (Clanachan, 2006). La contracture post-ischémique résulte de l'augmentation de la concentration cytosolique du calcium pendant l'ischémie suivie, lors de la réoxygénation, par une augmentation rapide de l'activité contractile. L'augmentation du calcium cytosolique pendant l'ischémie est liée au déséquilibre ionique, notamment d'une surcharge en sodium, activant l'échangeur calcium-sodium et en retour, une augmentation de la concentration cytosolique du calcium (Piper, 2003). L'acidification des cardiomyocytes a pour conséquence la perturbation et la réduction de la contractilité du cœur, menant à des arythmies (Raedschelders *et al.*, 2012). Selon Di Diego et Antzelevitch (2011), la cause majeure des arythmies est liée à un raccourcissement de la durée des potentiels d'action de basse amplitude, ainsi qu'à une réduction de la vitesse à laquelle s'effectue la dépolarisation membranaire permettant le déclenchement du potentiel d'action. Ceci est dû à la surcharge de Na^+ et de Ca^{2+} , ainsi qu'à l'accumulation extracellulaire de K^+ , qui surviennent à la suite de l'acidification par l'activation de l'échangeur Na^+/K^+ .

Bien que la restauration de la circulation à la zone ischémique soit indispensable pour prévenir les lésions tissulaires irréversibles, la reperfusion en soi peut engendrer plus de dommages myocardiques que ceux produits par l'ischémie proprement dite (Eltzschig and Collard, 2004). Lors de la reperfusion, le muscle cardiaque reprend très rapidement l'internalisation des AGNE plasmatiques qui se sont accumulés dans le sang. Par conséquent, l'oxydation subséquente très importante d'acides gras dans les cardiomyocytes va conduire à la génération de ROS par, entre autre, la chaîne de transport des électrons mitochondriale. Cette

internalisation accrue, ainsi que l'oxydation de ceux-ci, dans le but de produire de l'ATP très rapidement, afin de compenser la quantité insuffisante d'énergie produite au cours de l'ischémie, crée des dommages. En effet, lors de la reperfusion, de l'oxygène interagit avec la chaîne respiratoire endommagée des mitochondries produisant une énorme libération de ROS qui vont produire beaucoup plus de dommages (Adlam *et al.*, 2005). Au cours de la reperfusion, bien que la production d'ATP soit restaurée, le cœur reste tout de même inefficace dans l'utilisation de l'ATP. En effet, pour effectuer son travail mécanique, la contraction, l'oxydation des acides gras, entre autres, vont nécessiter plus d'énergie en raison des dommages subis au cours de l'ischémie. De plus, les pompes ioniques dépendantes de l'énergie exigent des quantités accrues d'ATP pour restaurer l'homéostasie ionique perturbée lors de l'ischémie (Clanachan, 2006).

La reperfusion du myocarde est également accompagnée d'une activation rapide de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) qui phosphoryle l'acétyl CoA carboxylase (ACC) qui est ainsi inhibée, ce qui permet la transformation de l'acétyl CoA en malonyl CoA. (Kudo *et al.*, 1996). L'oxydation des acides gras au détriment du glucose et de l'oxydation du pyruvate, lors de la reperfusion, va nuire à la récupération de la fonction cardiaque, en plus d'augmenter l'acidose intracellulaire, malgré la restauration de la circulation coronaire, et amener des dommages (Lopaschuk *et al.*, 2010, Liu *et al.*, 2002). En effet, les acides gras, en grande quantité, par leur nature souvent amphipathique, c'est-à-dire qui présente à la fois des régions hydrophobes et des régions hydrophiles, peuvent perturber les fonctions et la structure membranaire et des activités enzymatiques dans la cellule et les membranes subcellulaires. Des études histopathologiques ont montré une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le

myocarde soumis à ≥ 6 heures d'atteinte ischémique (Reeves *et al.*, 1989). Ils conduisent également à une augmentation de leur oxydation par les mitochondries, qui à leur tour génèrent des excès de NADH et FADH₂, ce qui conduit à la surproduction de ROS mitochondriales (Matsuda *et Shimomura*, 2014).

Donc, un épisode d'ischémie-reperfusion peut engendrer de nombreux dommages, comme une altération de la structure cardiaque, des problèmes au niveau de la fonction cardiaque, ainsi que du métabolisme énergétique (Jaswal *et al.*, 2011).

1.3. Les composantes du cœur

1.3.1. Les vaisseaux

Le cœur pompe le sang dans tout l'organisme pour acheminer à tous les tissus les nutriments et l'oxygène dont ils ont besoin, mais le cœur a également besoin de ces éléments pour effectuer ce travail. Pour se nourrir, le cœur utilise les artères coronaires à sa surface (épicaarde) et également des vaisseaux provenant de la cavité de ses ventricules pour nourrir l'endocarde, les vaisseaux artériossinoïdaux et artérioluminaux (Katz, 2011). Les artères coronaires sortant de l'aorte juste au-dessus de la valve aortique et se ramifiant sur les côtés gauche et droit du cœur, respectivement, permettent l'apport de sang artériel riche en oxygène et nutriments au muscle cardiaque. La grande veine du cœur, se trouvant près de l'artère coronaire gauche, permet de recueillir le sang veineux des capillaires myocardiques et de

l'apporter dans le sinus coronaire déversant le sang dans l'oreillette droite pour se faire oxygéner (Vigué-Martin, 2006).

1.3.2. Les cardiomyocytes

Le muscle cardiaque est composé de cardiomyocytes qui possèdent des stries transversales. Contrairement aux cellules du muscle squelettique, les cardiomyocytes sont des cellules courtes et épaisses qui ne possèdent qu'un seul noyau (Vigué-Martin, 2006). Ils possèdent de nombreuses mitochondries qui sont de forme allongées et qui sont en contact avec les fibres musculaires dans les cellules. Les cardiomyocytes, lorsqu'ils sont bout-à-bout, sont reliés entre eux par des disques intercalaires formés par les replis des deux cellules se rejoignant. Les cardiomyocytes possèdent également des jonctions communicantes facilitant la propagation de l'excitation d'une cellule à l'autre (Campbell et Reece, 2007).

1.3.2.1. Les mitochondries

La structure des mitochondries est unique puisqu'elles sont délimitées par une double membrane, constituée des membranes externe et interne. La membrane interne a une superficie beaucoup plus grande que la membrane externe, puisqu'elle est repliée sur elle-même à l'intérieur de la membrane externe formant ainsi un ensemble de replis, créant des crêtes, au centre desquelles se trouve la matrice mitochondriale. Ce repliement permet

d'augmenter jusqu'à cinq fois l'aire de la membrane interne comparativement à la membrane externe, ce qui a son importance dans les fonctions mitochondriales (Campbell et Reece, 2007).

Les mitochondries sont des organites de la cellule qui sont semi-autonomes puisqu'elles peuvent croître et se multiplier dans la cellule indépendamment de la division cellulaire. De plus, elles possèdent un génome mitochondrial (ADN) et des ribosomes leur permettant de produire plusieurs de leurs protéines membranaires, même si la plupart de leurs protéines proviennent de la cellule et sont transportées aux mitochondries à la suite de leur production (Campbell et Reece, 2007).

La densité des mitochondries dans le cytoplasme d'une cellule ainsi que leurs fonctions varient dépendamment du tissu, des conditions physiologiques ou pathologiques et des besoins énergétiques de la cellule (Vigué-Martin, 2006; Espoti *et al.*, 2012). Les cardiomyocytes, dont les besoins en énergie sont énormes, en possèdent un très grand nombre. De plus, le besoin énergétique dicte également la taille des mitochondries présentes dans la cellule (Espoti *et al.*, 2012). Les cardiomyocytes doivent donc contenir une grande quantité de mitochondries pour effectuer le métabolisme oxydatif et ainsi apporter l'énergie nécessaire pour la fonction contractile incessante du cœur.

Comme 98% de l'oxygène que nous respirons est utilisé par les mitochondries, ces dernières ont donc un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire et leur structure corrèle avec leur fonction puisqu'une grande partie de la machinerie permettant la production d'énergie par la mitochondrie est intégrée à sa membrane interne (Campbell et Reece, 2007; Stocchi *et al.*, 2007).

Les mitochondries utilisent leurs substrats métaboliques pour produire cette énergie en les activant à leur surface par l'acyl-Coenzyme A (CoA) synthétase en acyl-CoA. Les acyl-CoA sont, par la suite, transférés du cytoplasme de la cellule à la matrice de ses mitochondries par des transférases (carnitine acyl-transférase; CPT-I) (Katz, 2011). La transférase va transestérifier l'acyl-CoA en acyl-L-carnitine qui va être transportée vers la carnitine-acyl-L-carnitine translocase (CACT) de la membrane mitochondriale interne et, enfin, l'acyl-CoA va être régénérée à partir de l'acyl-L-carnitine par la transférase CPT-II latente à l'intérieur de la matrice mitochondriale (Glatz *et al.*, 2010). Les acides gras subissent alors la β -oxydation ainsi que le cycle de l'acide citrique (de Krebs) pour donner un bilan élevé d'adénosine triphosphate (ATP) grâce à la phosphorylation oxydative.

Le pyruvate, obtenu par la dégradation du glucose, entre dans la mitochondrie au moyen des transporteurs mitochondriaux du pyruvate (MPC). MPC1 and MPC2 s'associent à la membrane interne de la mitochondrie pour former un complexe oligomérique de 150 kDa. Le complexe ainsi formé permet le transport du pyruvate de l'espace intermembranaire à la matrice de la mitochondrie. Le pyruvate est alors transformé en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) (Bricker *et al.*, 2012).

Après leur libération par lypolyse, les acides gras à longue chaîne, activés en acyl-CoA dans le cytoplasme par l'acyl-CoA synthétase, sont métabolisés principalement par β -oxydation en présence d'oxygène dans les mitochondries ou les peroxysomes (Lopaschuk *et al.*, 2010). La β -oxydation consiste en la fragmentation de l'acyl-CoA à longue chaîne en acétyl-CoA fait de seulement deux carbones, contrairement aux longues chaînes ayant précédemment 16-18 carbones. Cette fragmentation se fait à l'aide d'une suite de quatre réactions se faisant de façon répétitive débarrassant à chaque fois l'acyl-CoA à longue chaîne

d'un acétyl-CoA à deux carbones. Ces réactions consistent en deux oxydations réduisant le NAD^+ et la flavine adénine dinucléotide (FAD) en NADH et FADH_2 (réoxydés par la chaîne respiratoire pour former de l'ATP), une hydratation et une thiololyse, reformant ainsi un acétyl-CoA (qui entre alors dans le cycle de Krebs) (Katz, 2011). Les quatre enzymes permettant ces réactions existent dans le cœur sous différentes isoformes qui possèdent une spécificité pour des acides gras dont la longueur de la chaîne varie (Lopaschuk *et al.*, 2010). La β -oxydation des acides gras, contrairement à la glycolyse, ne génère pas d'ATP par phosphorylation directe du substrat, mais produit un plus grand pouvoir réducteur (NADH et FADH_2) et d'acétyl-CoA.

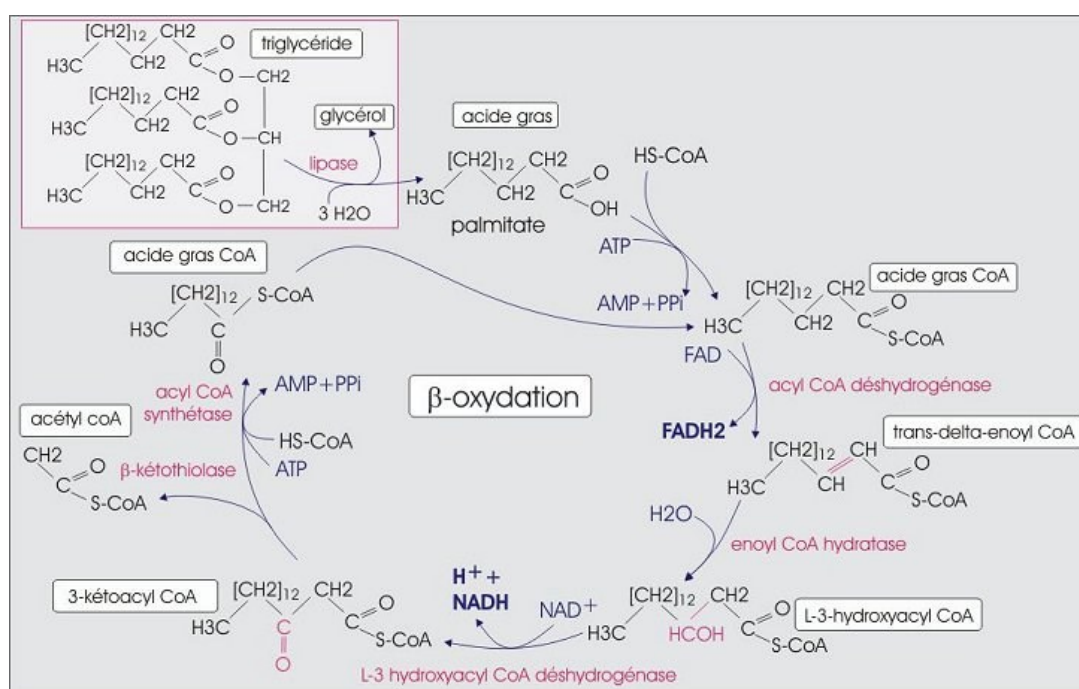


Figure 1.6 La β -oxydation des acides gras. Les quatre étapes du catabolisme des acides gras en acétyl-CoA (oxydation, hydratation, seconde oxydation et thiololyse). (Figure tirée du site suivant : http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.108.b3/content/_zoom.htm?images%5C10b_beta_oxydation_xl%2Ejpg+727+457)

Le NADH, H^+ ainsi que le $FADH_2$, produits lors des différentes voies cataboliques telles que la glycolyse, la β -oxydation et le cycle de Krebs, transportent les électrons de haute énergie qui vont être amenés à la membrane interne de la mitochondrie pour être utilisés dans la chaîne de transport des électrons afin de produire de l'énergie grâce à la formation d'un gradient électrochimique de protons dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Les électrons proviennent de l'oxydation du NADH et du $FADH_2$, transportés via quatre complexes protéiques (I, II, III et IV) et la chaîne de transport est complétée par l'ATP synthase (Campbell et Reece, 2007). Les électrons sont déplacés entre les complexes par deux transporteurs mobiles de la membrane, l'ubiquinone (Q) et le cytochrome c (Cyt c). Le transporteur Q permet la transition entre les complexes I (ou II) et le complexe III permettant ainsi le transfert des électrons du NADH provenant du complexe I (via une action NADH coenzyme Q réductase) et ceux du $FADH_2$ du complexe II (via une action succinate coenzyme Q réductase). Tandis que le complexe I transporte 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire, le complexe II n'en transporte aucun. Les complexes III (via une action coenzyme Q cytochrome C réductase) et IV (via une action cytochrome C oxydase) permettent le transport de 4 et 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire, respectivement. Le Cyt c se retrouve, quant à lui, entre les complexes III et IV. Les électrons vont donc être transportés d'un complexe à l'autre dans la chaîne jusqu'au complexe IV, où le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène, et ainsi former du dioxygène (O_2) et ensuite de l'eau avec un H^+ de la matrice. En effet, le gradient électrochimique de H^+ vers la matrice mitochondriale va entraîner le reflux des protons par le canal de l'ATP synthase fournissant l'énergie nécessaire à la synthèse pour phosphoryler l'ADP et produire de l'ATP (Campbell et Reece, 2007).

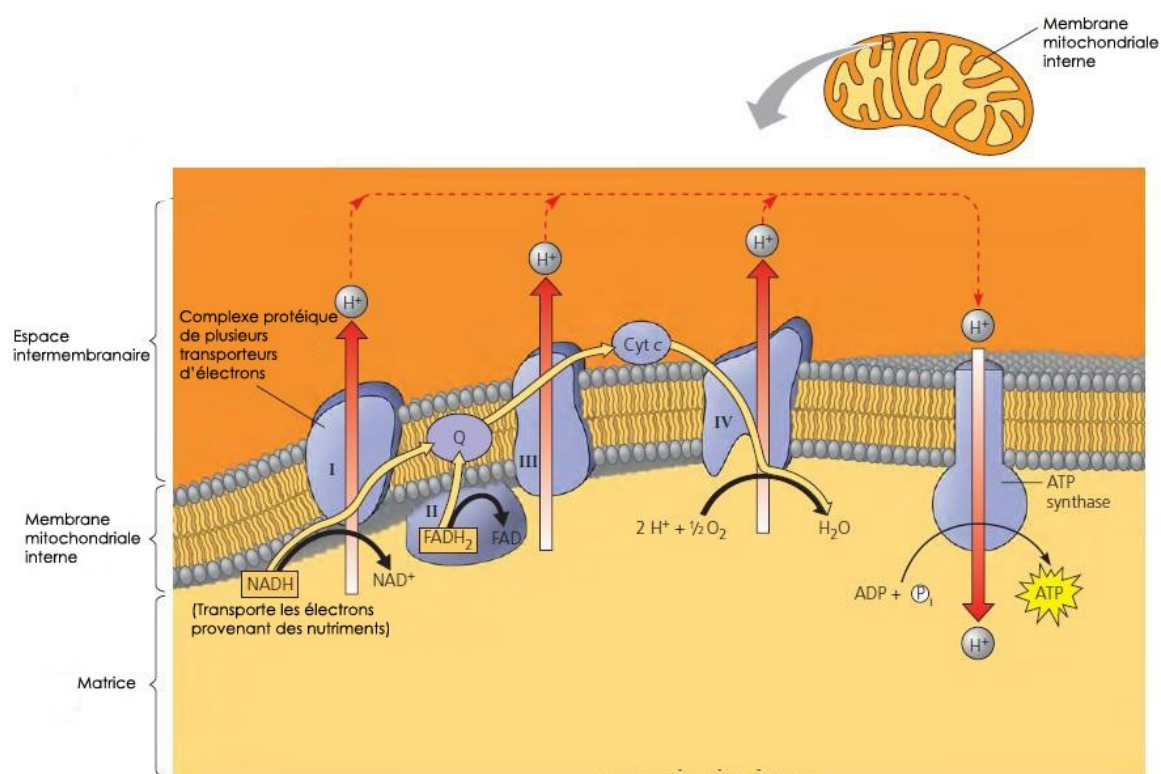


Figure 1.8 Phosphorylation oxydative : chaîne de transport des électrons. (Figure modifiée et traduite de Campbell et Reece, 2007).

Bien que le rôle principal et primordial des mitochondries soit la production d'énergie, celles-ci possèdent de nombreuses autres fonctions. En effet, outre la production d'énergie (phosphorylation oxydative), les mitochondries effectuent la biosynthèse des lipides et de l'hème, contribuent à l'homéostasie du calcium et régulent la mort cellulaire (Brenner *et al.*, 2012; Martel *et al.*, 2012; Kang et Peviaz, 2012). Non seulement les mitochondries contribuent au métabolisme des lipides, mais elles permettent également la biosynthèse de plusieurs lipides qui sont essentiels aux cellules et à l'organisme, dont les lipides membranaires et les phospholipides phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol et la cardiolipine (CL) (Mayr, 2014). Le PE est utilisé dans la synthèse de la

phosphatidylcholine (PC), le lipide le plus abondant de la membrane des eucaryotes. La CL est un diphosphatidyl-glycérol que l'on retrouve en grande quantité dans la membrane interne des mitochondries (de 3 à 10 fois plus que dans la membrane externe), constituée de deux acides phosphatidiques qui estérifient symétriquement les deux fonctions alcool primaires de la même molécule de glycérol (Mayr, 2014).

S'ajoutent aux fonctions mitochondriales la synthèse du coenzyme Q, l'activation de la vitamine D₃ via l'enzyme du cytochrome P450 mitochondrial CYP27A1 en 2-OH-D₃ oxydé par le CYP27B1 en 1,25 (OH)₂D₃ (calcitriol), qui est la forme hormonale active de la vitamine D nécessaire pour le maintien de l'homéostasie du Ca²⁺ et du phosphate (Jones *et al.*, 2014). De plus, la formation de prégnélonone via le CYP11A1, étape initiale de la synthèse d'hormones stéroïdiennes, et la formation de 27-hydroxycholestérol via CYP27A1, un précurseur pour la formation de sels biliaires, s'effectuent également dans la membrane interne des mitochondries (Mayr, 2014).

Les enzymes anti-oxydantes de la matrice mitochondriales sont essentielles afin de prévenir les dommages oxydatifs pouvant avoir lieu sur les composantes de la matrice mitochondriale. Parmi les systèmes anti-ROS mitochondriaux, on retrouve la glutathion peroxydase (GSHPx), une séléno-enzyme, la glutathion réductase, qui régénère les deux molécules de glutathion (GSH) réduit, la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD), la catalase, et le système thiorédoxine. Le GSH est un tripeptide avec un groupement thiol (-SH) au site actif, ce qui en fait une source abondante d'équivalents réducteurs (Stowe et Carnara, 2008).

1.3.2.1.1. Le rôle des mitochondries dans le MI/R

Il a été démontré que des défaillances mitochondriales sont des éléments menant à des dommages que l'on peut observer lors d'une ischémie-reperfusion du myocarde. En effet, un déséquilibre énergétique et une altération de la respiration mitochondriale et de l'utilisation des substrats a été démontrée lors de cardiopathies ischémiques chez les rongeurs ainsi que chez l'homme (Brenner *et al.*, 2012). Les dysfonctions mitochondriales engendrent un stress oxydatif, et sont fréquemment considérées comme des événements conduisant à une variété de maladies incluant le diabète, les cancers ainsi que les maladies cardiovasculaires au niveau du foie, du cerveau et du cœur (Espoti *et al.*, 2012; Kang et Pervaiz, 2012). La maladie cardiovasculaire hépatique est l'hépatite ischémique, que l'on nomme également foie de choc, foie cardiaque aigu, foie hypoxique ou encore insuffisance hépatique post-choc. L'hépatite ischémique est une hépatite aiguë avec une présence des aspartates aminotransférases beaucoup plus élevée que la normale en l'absence de toute autre cause virale ou toxique. L'atteinte hépatique se caractérise par une baisse de la synthèse hépatique et des capacités de détoxification. L'aspect histologique de l'hépatite ischémique est typiquement une nécrose centrolobulaire (Mercier et Perrotin, 2003).

Les dommages survenus lors de l'ischémie sont plus complexes que seulement la déplétion en O₂ et en ATP et l'accumulation de CO₂. En effet, ces événements représentent simplement les premières conséquences de l'ischémie, qui à leur tour induisent une multitude de changements au niveau cellulaire, tissulaire, et au niveau de l'organe.

On estime que seulement 1 à 2% des électrons passant à travers la chaîne de transport des électrons mitochondriale, dans des conditions physiologiques normales, entraînent la

production d'anions superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Ces $O_2^{\bullet-}$ générés normalement régulent des fonctions cellulaires importantes, y compris le métabolisme, la prolifération et l'apoptose (Raedschelders *et al.*, 2012). En revanche, la génération de l' $O_2^{\bullet-}$ au cours de l'ischémie et de la reperfusion du cœur se produit à une échelle beaucoup plus grande. Il est vrai que les mitochondries sont la principale source de ROS, mais elles sont également leur principale cible lorsqu'elles sont générées en excès et cela va conduire à des dommages sévères (Murphy et Steenbergen, 2008). La régulation de la quantité produite d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par leur détoxification est un rôle très important des mitochondries car bien que les ROS soient indispensables pour diverses voies de signalisation, une quantité excessive peut mener à des dommages tissulaires et à la mort cellulaire (Kang et Peviaz, 2012).

L'augmentation des ROS pendant l'ischémie et la réoxygénation est principalement due aux dommages causés aux composantes de la chaîne de transport des électrons résultant en un transfert inefficace d'électrons par les complexes et à la génération de ROS par les complexes I et III de la chaîne de transport des électrons mitochondriale (Murphy et Steenbergen, 2008). En effet, lors de l'ischémie, le flux d'électrons de la chaîne de transport des électrons est inhibé au-delà du complexe III. Donc, la respiration ainsi que la production d'ATP mitochondriale est diminuée, ce qui va amener une augmentation du ratio $NADH/NAD^+$ (Raedschelders *et al.*, 2012). Les ROS générées pendant l'ischémie sont induites par la peroxydation de la cardiolipine, un lipide mitochondrial jouant un rôle dans la stabilité et l'activité de la cytochrome c oxydase. Cela inhibe et empêche le flux d'électrons au-delà du cytochrome c qui est la liaison entre le complexe III et IV. Le complexe III ne pouvant transmettre ses électrons au complexe IV, ses ubiquinones Q_0 et Q_i vont produire de l' $O_2^{\bullet-}$ et le complexe I va réduire la flavine mononucléotide (FMN) et produire de l' $O_2^{\bullet-}$ également. Les ROS produites par le

Q_i et le complexe I sont générées dans la matrice contrairement au Q_o qui les génère dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Raedschelders *et al.*, 2012).

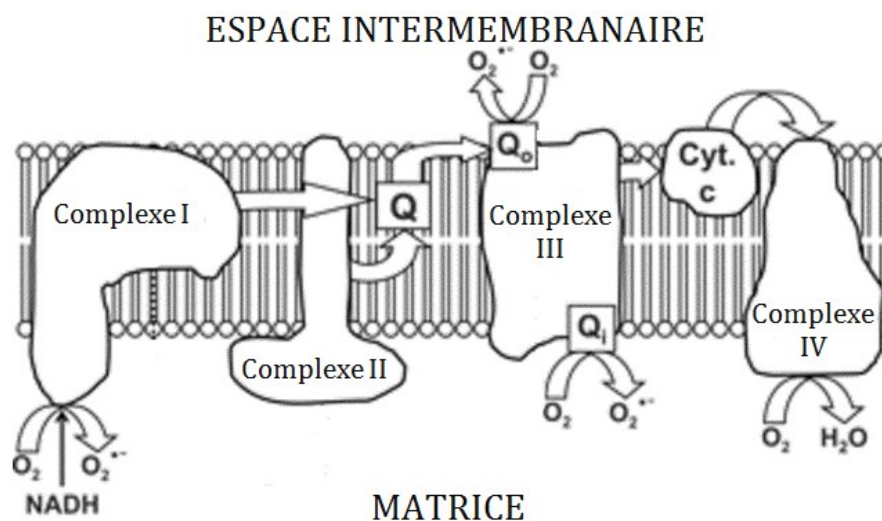


Figure 1.9 Production de ROS par les complex I et III de la chaîne de transport des électrons.
(Figure modifiée et traduites de von Bergen *et al.*, 2009)

Lors de la reperfusion, le cycle de Krebs est réactivé, mais l'inhibition du flux d'électrons au-delà du complexe III est encore présente et cela augmente la génération de $O_2^{\bullet-}$ au complexe III. Par contre, le pompage des protons au niveau des complexes I et III, rétabli mais faiblement, va permettre la synthèse d'une petite quantité d'ATP (Raedschelders *et al.*, 2012). Donc, lorsqu'il y a réapprovisionnement en oxygène, il y a régénération d'ATP, mais les dommages subis aux chaînes de transport des électrons donnent comme résultat une augmentation de la génération de ROS qui peuvent engendrer différents problèmes, comme l'activation des enzymes protéolytiques des cellules dont les métalloprotéinases, et l'induction de la mort cellulaire (Raedschelders *et al.*, 2012).

Il existe également de multiples autres sources cellulaires de ROS qui incluent l'activité du cytochrome P450 cellulaire et l'activité de l'oxyde nitrique synthase. Il y a aussi la conversion de la xanthine déshydrogénase cellulaire en xanthine oxydase. Dans des conditions physiologiques normales, l'hypoxanthine est convertie en xanthine par la xanthine déshydrogénase qui utilise le NAD comme substrat. Lors d'une ischémie, par contre, la xanthine déshydrogénase est convertie en xanthine oxydase qui utilise l'oxygène comme substrat (Eltzschig and Collard, 2004). Par conséquent, au cours de l'ischémie, la xanthine déshydrogénase est incapable d'effectuer la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, ce qui entraîne une accumulation d'hypoxanthine dans le tissu. Lorsque l'oxygène est réintroduit lors de la reperfusion, la conversion de l'hypoxanthine en excès par la xanthine oxydase va mener à la formation de ROS (Eltzschig et Collard, 2004; Raedschelders *et al.*, 2012).

Les phagocytes contribuent également à la production d' $O_2^{\bullet-}$ dans le myocarde en condition post-ischémique en raison de l'infiltration des neutrophiles. Ces leucocytes expriment le complexe enzymatique NAD(P)H oxydase qui est assemblé à la membrane cellulaire lors de son activation et qui utilise soit le NADH ou le NADPH comme substrats pour réduire d'un électron l' O_2 . Bien que l'activité de cette enzyme soit traditionnellement attribuée à l'activation du système immunitaire, les myocytes cardiaques expriment également des isoformes de celle-ci qui contribuent à la production des ROS au cours de l'ischémie et de la reperfusion (Raedschelders *et al.*, 2012).

1.3.2.1.2. L'ouverture du mPTP

Le mPTP est un canal multiprotéique de haute conductance voltage-dépendant situé dans la membrane interne mitochondriale. Lorsque celui-ci est complètement ouvert, cela crée un pore ayant un diamètre de 3 nm, permettant le passage d'éléments ayant des masses moléculaires allant jusqu'à environ 1,5 kDa (Di Lisa et Bernardi, 2006).

Au cours de l'ischémie, lorsque l'ATP est progressivement épuisé, il va y avoir une diminution du pH intracellulaire puisque les protons formés lors de la glycolyse anaérobie s'accumulent et que le fonctionnement des pompes ioniques membranaires ATP-dépendantes est altéré (Eltzschig and Collard, 2004; Murphy et Steenbergen, 2008). En effet, la diminution de la respiration mitochondriale, ainsi que de la production d'ATP qui ont lieu au cours de l'ischémie engendrent une augmentation du ratio NADH/NAD⁺ (Raedschelders *et al.*, 2012). L'accumulation de protons active les échangeurs Na⁺/H⁺ et Na⁺/Ca²⁺ de la membrane plasmique afin d'expulser les protons, mais il en résulte une accumulation intracellulaire de calcium. Cela entraîne donc l'activation des pompes calciques, accélérant ainsi davantage l'épuisement de l'ATP, et l'entrée et l'accumulation du calcium dans les mitochondries également. Des études ont montré qu'une concentration élevée de calcium dans les mitochondries active le mPTP, mais puisque le pH est bas, ce qui inhibe son ouverture, celle-ci se fera préférentiellement lors de la reperfusion lorsque le pH sera de retour à la normale (Murphy et Steenbergen, 2008).

L'ouverture du mPTP va rapidement conduire au gonflement des mitochondries et à la libération de cytochrome c, qui va activer la voie de l'apoptose (Murphy et Steenbergen, 2008). En effet, le gonflement de la mitochondrie va entraîner la rupture de sa membrane

externe, ce qui va permettre la libération des éléments de l'espace intermembranaire comme le cytochrome c qui, une fois dans le cytoplasme de la cellule, va aller lier le facteur 1 activateur de peptidases apoptotiques (Apaf-1) qui va activer la caspase 9 (Di Lisa et Bernardi, 2006). Les caspases activées vont cliver l'ADN et d'autres composantes cellulaires, comme des protéines mitochondriales, et ainsi contribuer à la mort cellulaire en engendrant l'apoptose. Les caspases 9 sont activées pendant l'ischémie, tandis que les caspases 8, ainsi que les caspases 9, sont activées au cours de la reperfusion. Le clivage du cytosquelette ou des constituants de la membrane plasmique sont également des cibles des caspases conduisant à la rupture de la membrane plasmique (Murphy et Steenbergen, 2008).

En résumé, les conditions liées à la reperfusion post-ischémique, comme l'accumulation de ROS, la normalisation du pH et l'augmentation de la concentration calcique, créent un scénario idéal pour l'ouverture du PTP.

1.3.2.2. Le récepteur éboueur CD36

Le récepteur CD36 est aussi nommé glycoprotéine IIIb/IV ou translocase d'acides gras (FAT). Des mutations au niveau du gène de ce récepteur chez l'humain sont observées chez 5 à 10% des asiatiques et des africains et jusqu'à 1% de ces populations sont, en fait, déficients en CD36 (Rač *et al.*, 2007). De plus, 7 à 10% des japonais et autres populations asiatiques montrent une absence de l'expression du CD36 sur les plaquettes tout en conservant son expression sur les autres types cellulaires chez ces individus (Silverstein, 2009).

Il existe deux phénotypes différents dans lesquels le CD36 est absent dans des proportions différentes. Le phénotype de type I se caractérise par l'absence de CD36 sur les plaquettes et sur les monocytes/macrophages tandis que, pour le phénotype de type II, il y a absence d'expression du CD36 sur les plaquettes mais une expression normale sur les monocytes/macrophages. Ces phénotypes se retrouvent chez 0,3% et 4% des japonais, respectivement (Kashiwagi *et al.*, 2001).

De nombreuses mutations dans le gène du récepteur CD36 peuvent être la cause de cette déficience en CD36. Il s'agit principalement d'insertion ou de délétion de nucléotides dans la séquence entraînant une diminution de la quantité d'acide ribonucléique messager (ARNm) du CD36 produite ou l'apparition d'un codon stop prématuré (tableau 1.2).

Des anomalies métaboliques ont été observées chez les personnes présentant une déficience en récepteurs CD36, sans toutefois avoir été associées à une mutation spécifique. En effet, on peut observer une anomalie du métabolisme lipidique et du glucose chez les personnes ayant une déficience de type I. Une élévation des taux plasmatiques de triglycérides, une diminution du HDL-cholestérol, une intolérance au glucose ont été observées chez ces sujets (Miyaoka *et al.*, 2001).

Tableau 1.2. Résumé des anomalies génétiques possibles au niveau du récepteur CD36 chez les personnes déficientes en CD36 de type I ou II.

Mutations	Position des nucléotides	Modifications	Codons/exons	Conséquences	Références
Substitution	478	Changer : C→T	Codon 90	- changer Pro → Ser	Kashiwagi <i>et al.</i> , 1995
délétion dinucléotide	539-540		Codon 110	- diminution de la quantité d'ARNm du CD36	Kashiwagi <i>et al.</i> , 1994
Insertion d'un nucléotide	1159-1160	Insertion : A	Codon 317	- codon stop prématuré - diminution de la quantité d'ARNm du CD36 dans les macrophages	Kashiwagi <i>et al.</i> , 1996
Délétion/insertion d'une mutation	839-841	Délétion : GAG Insertion : AAAAC	Exon 7	- codon stop prématuré - diminution de la quantité et instabilité de l'ARNm du CD36	Kashiwagi <i>et al.</i> , 2001
Délétion de 12 pb avec ou sans exon 9 sauter	1438-1449	délétion de 4 a.a.	Exon 13	- codon stop prématuré Exon 9 sauté : - défauts dans la maturation et dans le transport intracellulaire du CD36	Kashiwagi <i>et al.</i> , 2001

a.a., acide aminé; A, adénine; ARNm, acide ribonucléique messenger; C, cytosine; G, guanine; pb, paire de bases; Pro, proline; Ser, sérine; T, thymine.

Des modifications métaboliques dues à l'absence du récepteur CD36 peuvent également être observées chez les rats spontanément hypertendus (SHR). En effet, ces rats montrent une déficience en récepteur CD36 ayant comme conséquence une augmentation de l'internalisation du glucose, une hyperinsulinémie et une hypertrophie du cœur. L'ajout d'un supplément en acides gras à chaîne courte à leur alimentation, qui ne requiert pas le CD36 pour être transportés à travers la membrane plasmique, élimine ces problèmes chez le rat SHR sans toutefois atténuer leur hypertension. L'hypertension spontanée chez ces rats n'est donc pas due à un problème d'approvisionnement en acides gras par le CD36 (Hajri *et al.*, 2001).

1.3.2.2.1. La structure du CD36

Le récepteur CD36 est une glycoprotéine transmembranaire faisant partie de la famille des récepteurs éboueurs (*scavengers*) de type B. Les récepteurs scavengers sont des protéines membranaires qui interviennent, entre autres, dans l'endocytose de lipoprotéines modifiées (Acton *et al.* 1994). Il s'agit d'une protéine constituée de 472 acides aminés, lui conférant un poids moléculaire de 53 kDa. Toutefois, elle présente de nombreux sites de glycosylation, dont 10 sites sur son domaine extracellulaire. Donc, selon le niveau de glycosylation que l'on retrouve dans les différents types cellulaires l'exprimant, son poids moléculaire augmente entre 78 et 88 kDa (Glatz *et al.*, 2013; Rać *et al.*, 2007).

Le récepteur CD36 est une protéine qui a été très conservée au cours de l'évolution, se retrouvant même chez les mouches, les vers et les éponges. En effet le CD36, ainsi que d'autres récepteurs éboueurs, ont évolué en faisant partie du système immunitaire inné en tant que molécules de reconnaissance des agents pathogènes et des cellules infectées par des agents pathogènes (Silverstein, 2009). Cette conservation est facilitée puisqu'il n'y a qu'un seul gène qui encode le récepteur CD36. Celui-ci comporte 15 exons, dont les deux premiers ainsi que le dernier sont non-codants (Rać *et al.*, 2007). Le gène est situé sur le chromosome 7 humain et sur le chromosome 5 murin (Rać *et al.*, 2007). Des mutations ou des délétions dans le domaine C-terminal du CD36 abolissent les réponses de signalisation dans les cellules transfectées avec ceux-ci (Huang *et al.*, 2011).

Le récepteur CD36 est composé d'un très grand domaine extracellulaire, de deux passages transmembranaires, et de deux courts domaines cytoplasmiques étant les domaines N- et C-terminaux (Armesilla *et al.*, 1994). Il y a six résidus cystéine dans le domaine

extracellulaire formant trois ponts disulfures, ainsi que deux sites de phosphorylation (Rać *et al.*, 2007; Glatz *et al.*, 2010). Les ponts disulfure sont formés entre les Cys 243-311, 272-333 et 313-322 et sont nécessaires au transport des récepteurs à la membrane (Nergiz-Unal *et al.*, 2011). La phosphorylation de la sérine en position 237 du récepteur semble réguler le transport par le CD36, puisque cela diminue, mais modestement, l'internalisation des acides gras dans les plaquettes humaines (Glatz *et al.*, 2010). De plus, la glycosylation des résidus asparagine dans le domaine extracellulaire semble nécessaire pour réguler le trafic du récepteur à la membrane plasmique (Silverstein et Febbraio, 2009).

Les domaines intracellulaires N- et C-terminaux, quant à eux, sont composés de 6 et 12 résidus, respectivement, et possèdent chacun deux résidus cystéine palmitoylés qui permettent le positionnement du récepteur à la membrane dans les cavéoles et les radeaux lipidiques (Febbraio et Silverstein, 2007, Nergiz-Unal *et al.*, 2011). Le domaine C-terminal comporte aussi deux résidus lysine qui sont des sites d'ubiquitination impliqués dans la disponibilité du récepteur CD36 à la membrane (Glatz *et al.*, 2010; Kuda *et al.*, 2013).

Donc, nous pouvons dire que le récepteur CD36 est hautement régulé par de nombreuses modifications post-traductionnelles, comme la glycosylation, la palmitoylation et l'ubiquitination (Glatz *et al.*, 2010)

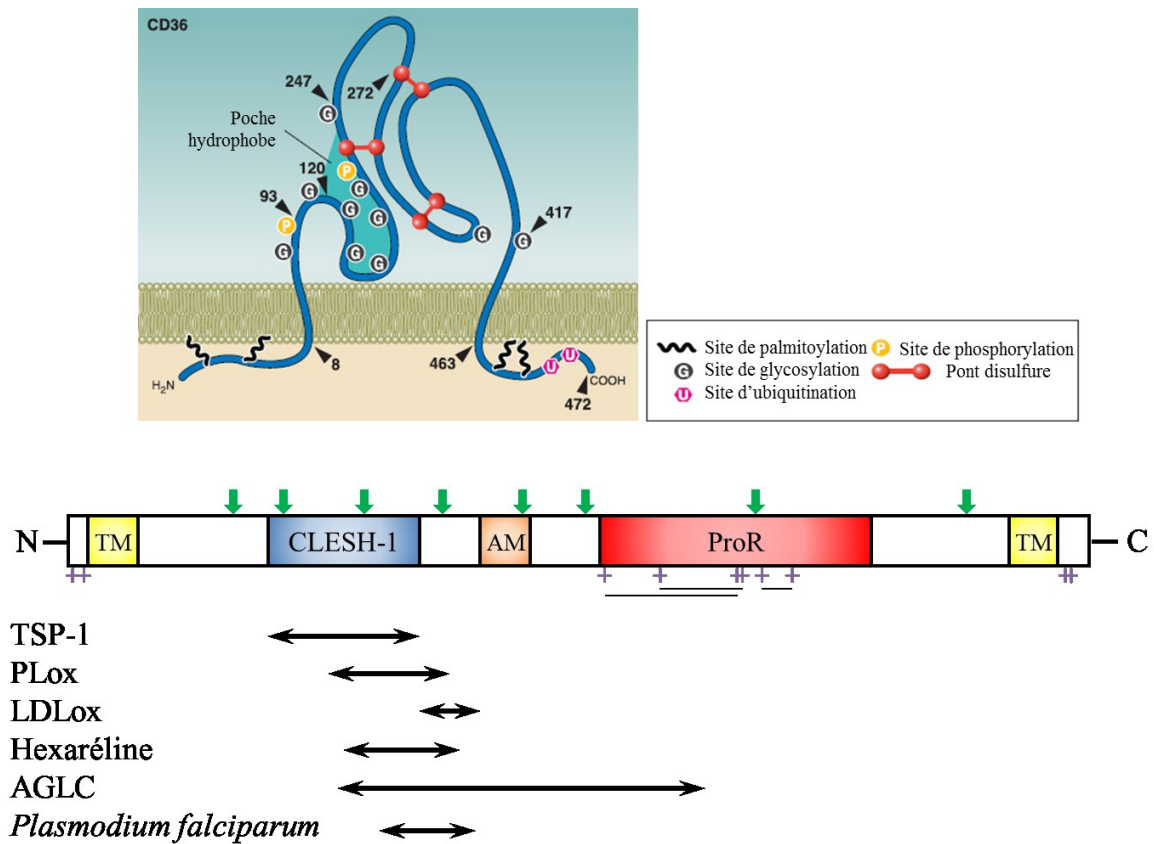


Figure 1.10 Structure du récepteur CD36 montrant les différents sites de liaison de ses ligands. Les flèches vertes indiquent les sites de glycosylation et les croix indiquent les cystéines, et la formation de ponts disulfures. Les flèches horizontales à deux pointes à la droite des ligands désignent leur site de liaison au récepteur CD36. TM, domaine transmembranaire; AM, domaine associé à la membrane; CLESH-1, *CD36 LIMP II Emp structural homology-1*; ProR, région riche en proline. (Figure modifiée et traduite de Glatz *et al.*, 2010; Nergiz-Unal *et al.*, 2011)

Le large domaine extracellulaire du récepteur entre les acides aminés 184 à 204 de la protéine (Silverstein et Febbraio, 2009), se replie entre ses 2 passages transmembranaires vers la surface de la cellule où il va interagir avec la membrane. Cette région est le principal site de liaison avec ses ligands. Ce domaine de liaison se retrouve ainsi dans une région hydrophobe

du récepteur, ce qui lui permet de se lier avec des ligands comme les acides gras à longues chaînes (AGLC) (Collot-Teixeira *et al.*, 2007; Febbraio et Silverstein, 2007) entre les acides aminés 127 et 279 (Baillie *et al.*, 1996). Le site de liaison pour les lipoprotéine de basse densité oxydée (LDLox), entre les acides aminés 155 et 183, est aussi situé au niveau de la poche hydrophobe du récepteur (Puentes Navazo *et al.*, 1996).

1.3.2.2.2. La répartition/distribution du récepteur CD36

Le récepteur CD36 a été identifié pour la première fois sur les plaquettes, mais il se retrouve à la surface de nombreux types cellulaires, comme les monocytes, les macrophages et cellules dendritiques, les adipocytes, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes (Febbraio *et al.*, 2002; Sabatino *et al.*, 2011; Greenwalt *et al.*, 1992; Rać *et al.*, 2007). Sur les plaquettes, le récepteur CD36 est l'une des glycoprotéines les plus abondantes avec 10 000 à 25 000 récepteurs par plaquette (Nergiz-Unal *et al.*, 2011). On peut donc constater que la distribution tissulaire et cellulaire du récepteur CD36 est très variée ce qui explique, du moins en partie, le fait qu'il est multifonctionnel. Cependant, 50% des récepteurs CD36 d'une cellule se retrouvent dans le compartiment intracellulaire (Luiken *et al.*, 2002). Ils sont emmagasinés dans des endosomes intracellulaires pour être transloqués et recrutés à la membrane afin d'y augmenter leurs effets ou pour être amenés vers une voie de dégradation selon les circonstances (Schwenk *et al.*, 2008; Glatz *et al.*, 2010). Pour faciliter et permettre le va-et-vient des récepteurs à la surface des cellules, ceux-ci sont colocalisés avec d'autres éléments comme la cavéoline-1 ou associés à des microdomaines riches en cholestérol et sphingolipides de la membrane plasmique. Les cavéolines, de petites protéines membranaires de 22 kDa

responsables de l'invagination de la membrane plasmique au niveau des cavéoles, offrent des sites d'ancrage à la membrane au récepteur CD36 (Glatz *et al.*, 2010). Elles auraient donc un rôle à jouer dans l'entreposage des récepteurs CD36 dans les endosomes intracellulaires. La translocation des récepteurs va ainsi permettre de réguler leurs effets, comme l'internalisation des acides gras (Luiken *et al.*, 2004). Lors de la contraction du muscle cardiaque, la translocation des récepteurs CD36 des endosomes jusqu'à la membrane plasmique se fait via l'activation de l'AMPK, dans le but de faciliter l'internalisation des acides gras (Lupaschuk *et al.*, 2010; Schwenk *et al.*, 2010). L'AMPK ainsi que la kinase-3 phosphoinositide (PI3-K) vont activer l'Akt, engendrant la translocation des vésicules contenant le CD36 à la membrane plasmique (Schwenk *et al.*, 2008). La contraction musculaire augmente également la translocation à la membrane cellulaire des protéines de liaison des acides gras de la membrane plasmique (FABPpm) et des protéines de transport des acides gras 1 et 4 (FATP1 et FATP4) (Schwenk *et al.*, 2010). L'augmentation du nombre de transporteurs des acides gras à la membrane, dont le récepteur CD36, induite par la contraction des muscles squelettique et cardiaque, est liée de façon linéaire avec l'intensité de la contraction musculaire. L'absorption des acides gras dans le muscle est donc reliée à ses exigences métaboliques (Glatz *et al.*, 2010). Cette translocation du CD36 à la membrane est un processus rapide et réversible (Schwenk *et al.*, 2010). La protéine CD36 n'est pas seulement localisée à la membrane plasmique et dans les endosomes, elle est également localisée à la membrane des mitochondries, où elle semble contribuer à la régulation de l'oxydation des acides gras (Glatz *et al.*, 2010).

La régulation du nombre de récepteurs CD36 présents dans la cellule se fait grâce à sa polyubiquitination, c'est-à-dire par la liaison de plusieurs protéines d'ubiquitine, un peptide de

76 acides aminés, sur le récepteur amenant à sa dégradation. En effet, le domaine C-terminal du CD36 comporte deux résidus lysine qui peuvent être ubiquitinés entraînant la dégradation du CD36 dans la cellule par le protéasome (Kuda *et al.*, 2013). La signalisation du récepteur à l'insuline va diminuer cette ubiquitination, augmentant ainsi la disponibilité du récepteur CD36 pour sa distribution vers la membrane. Dans les cardiomyocytes, l'insuline augmente l'expression et la translocation du CD36 à la membrane (Schwenk *et al.*, 2010). De plus, la leptine peut également augmenter, pendant une courte période par contre, la translocation du CD36 à la membrane, puisque par la suite elle diminue l'expression du CD36 à la membrane afin de normaliser l'internalisation des acides gras (Glatz *et al.*, 2010). En revanche, les acides gras, lors de leur accumulation dans la cellule vont augmenter l'ubiquitination, augmentant de ce fait la dégradation du récepteur CD36, agissant ainsi comme rétrocontrôle négatif (Silverstein et Febbraio, 2009; Lopaschuk *et al.*, 2010).

En plus de sa régulation par les modifications post-traductionnelles, l'expression du CD36 est régulée au niveau transcriptionnel par des cytokines inflammatoires telles que le *granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor* (GM-CSF), le *macrophage-colony-stimulating factor* (M-CSF), et l'interleukine-4 (IL-4) qui permettent d'augmenter sa transcription (Silverstein, 2009).

La distribution du récepteur CD36 est prédominante dans les tissus qui métabolisent les acides gras et qui sont des sites où il y a un transport important des acides gras (Acton *et al.* 1994; Van Nieuwenhoven *et al.*, 1995).

1.3.2.2.3. Les nombreux rôles du CD36

Le récepteur CD36 est une protéine transmembranaire impliquée dans un très grand nombre d'évènements, autant physiologiques que pathologiques (Silverstein *et al.*, 2009). Au niveau cardiaque, le récepteur CD36 a un rôle très important dans l'apport et la régulation énergétique (Febbraio *et al.*, 2002; Glatz *et al.*, 2013; Luiken *et al.*, 2004). Il participe ainsi à l'utilisation des lipides chez les myocytes, au stockage de l'énergie chez les adipocytes et à l'absorption intestinale de la graisse chez les entérocytes. Toutefois, cela peut contribuer à la pathogenèse de troubles métaboliques, comme le diabète et l'obésité (Silverstein et Febbraio, 2009). De plus, il participe également à l'absorption des caroténoïdes pour le métabolisme de la vitamine A dans l'intestin (Silverstein et Febbraio, 2009).

Le récepteur CD36 est connu pour son rôle dans le développement de l'athérosclérose, puisqu'il lie les formes modifiées de lipoprotéines de faible densité (*low density lipoprotein*, LDL) et qu'il procède à leur internalisation dans la cellule (Collot-Teixeira *et al.*, 2007; Marleau *et al.*, 2005). La liaison des LDLox au récepteur CD36 va déclencher des voies de signalisation pro-inflammatoires et pro-athérogéniques. L'activation des kinases de la famille des Src, des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), et des Vav, facteurs d'échange du nucléotide guanylique, entraîne l'internalisation des LDLox, la formation des cellules spumeuses et l'inhibition de la migration des macrophages dans le tissu (Park *et al.*, 2009). De plus, les LDLox entraînent l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ b) de manière CD36-dépendante (Silverstein *et al.*, 2010). En effet le CD36, exprimé chez les monocytes et les macrophages, contribue à la phase précoce de l'athérosclérose puisqu'il permet l'endocytose des LDLox dans les macrophages, engendrant ainsi la formation des

cellules spumeuses qui sont en grande majorité responsables de la formation des plaques athéromateuses (Bodart *et al.*, 2002). Des études *in vitro* ont permis de déterminer que les récepteurs éboueurs CD36 et SR-A effectuent de 75% à 90% de l'internalisation des LDLox dans les macrophages (Kunjathoor *et al.*, 2002). L'inhibition de la migration contribue ainsi au piégeage des cellules spumeuses à l'intérieur de la plaque d'athérome. Il a été démontré par des études *in vitro* que l'incubation des macrophages avec des LDLox mène à l'activation des MAPK, JNK1 et JNK2 (*c-Jun N-terminal kinase 1 et 2*), de façon dépendante de la dose et du temps et que cette activation est également régulée par le CD36 puisqu'elle n'a pas lieu chez les macrophages déficients en CD36 (Silverstein *et al.*, 2010).

De plus, lors de l'athérosclérose, les récepteurs CD36 qui sont exprimés à la surface des plaquettes vont également lier les LDLox. Cette liaison sur les plaquettes va mener à l'activation de celles-ci et les rendre plus sensibles et réactives à de faibles concentrations de leurs ligands agonistes, comme le collagène et l'ADP, et ainsi induire leur agrégation lors de la formation d'une plaque athéromateuse et d'un thrombus (Silverstein, 2009). Le récepteur CD36 a donc non seulement un rôle pro-athérogénique mais aussi un rôle pro-thrombotique dans le système vasculaire. La liaison d'un ligand sur le récepteur CD36 peut également entraîner une vasoconstriction coronarienne, qui peut être à l'origine des vasospasmes pouvant avoir lieu dans l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose (Bodart *et al.*, 2002).

1.3.2.2.3.1. Les nombreux ligands endogènes du récepteur CD36

Pour mentionner d'autres ligands endogènes du récepteur CD36 non mentionnés ci-dessus, il y a également les microparticules dérivées de cellules (MP), de petites vésicules liées à la membrane qui bourgeonnent hors des cellules normales en raison de l'apoptose et/ou de l'activation des cellules, ainsi que les phosphatidylsérines (PS) et PS oxydées (oxPS) qui sont exprimées à la surface des cellules apoptotiques (Silverstein, 2009). En effet, les MP perdent l'asymétrie de leur membrane et expriment ainsi des phospholipides anioniques tels que la PS sur leur surface qui lie le récepteur CD36 à la surface des plaquettes (Silverstein *et al.*, 2010).

Comme il a été mentionné plus haut, le récepteur CD36 lie également les LDLox. Toutefois, il ne lie pas les LDLox délipidées. En effet, des études au début des années 2000 ont permis de déterminer un motif structural commun à la majorité des phospholipides oxydés liant le récepteur CD36. En fait, l'acide gras insaturé à la position *sn*-2 de la PC est tronqué au niveau du site de la double liaison la plus proximale et contient soit un acide carboxylique terminal ou un aldéhyde avec une double liaison en position bêta et un alcool ou une cétone en position gamma. Ceux-ci sont appelés les oxPC_{CD36} (Silverstein *et al.*, 2010). Une caractéristique importante des oxPC_{CD36}, est qu'ils ne se lient pas à d'autres récepteurs éboueurs que le CD36 (Ashraf *et al.*, 2008). Ils représentent donc un réactif expérimental idéal pour déterminer les conséquences en aval de la liaison des LDLox sur des cellules via le CD36 (Silverstein *et al.*, 2010).

Sur les autres types cellulaires, le récepteur CD36 lie beaucoup d'autres ligands. En effet, il lie la thrombospondine-1 (TSP1) et plusieurs autres protéines contenant des motifs

répétitifs de la thrombospondine de type 1 (TSR) sur les cellules endothéliales de la microvasculature (Silverstein et Febbraio, 2009). La TSP1 a un rôle dans l'activation des plaquettes, mais le récepteur CD36 la lie également sur d'autres cellules que les plaquettes, comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Nergiz-Unal *et al.*, 2011). La liaison du récepteur avec TSP1 se produit sur les résidus 93-155 et induit une réponse anti-angiogénique et pro-apoptotique puissante par l'activation d'une tyrosine kinase spécifique de la famille des Src, Fyn, et d'une kinase spécifique de la famille des MAPK sérine/thréonine, p38 (Silverstein *et al.*, 2010, Nergiz-Unal *et al.*, 2011). Dans les plaquettes et les cellules musculaires lisses, la liaison du TSP1 au CD36 inhibe l'augmentation du GMPc ou d'AMPc et donc l'activation consécutive des protéine-kinases dépendantes du GMPc/AMPc (Nergiz-Unal *et al.*, 2011).

Sur les cellules sensorielles, le CD36, présent sur les antennes d'insectes, est impliqué dans la signalisation induite par les phéromones dérivées des acides gras chez les insectes. De plus, chez les rongeurs, il est impliqué dans leur préférence alimentaire pour le gras. En effet, le CD36 a un rôle dans les réponses sensorielles chimiques chez les mammifères puisqu'il est abondant à la surface apicale des bourgeons caliciformes gustatifs dans les papilles linguales (Silverstein et Febbraio, 2009).

Dans de nombreuses cellules, les récepteurs CD36 peuvent également interagir avec d'autres récepteurs membranaires, comme les tétraspanines et les intégrines (Silverstein et Febbraio, 2009). Plusieurs aspects de la fonction et de la signalisation du CD36 nécessite une association fonctionnelle et/ou physique avec d'autres récepteurs membranaires, y compris les récepteurs de type Toll (TLR) (Huang *et al.*, 2011) L'interaction du CD36 avec les

tétraspanines à la surface des macrophages joue un rôle dans la transformation des macrophages en cellules spumeuses (Nergiz-Unal *et al.*, 2011). En effet, la tétraspanine CD9 est associée avec le récepteur CD36 à la surface des macrophages et participe à l'internalisation des LDLox de façon dépendante du CD36. De plus, l'internalisation des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques et les segments externes de photorécepteurs par les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine impliquent à la fois le CD36 et l'intégrine $\alpha V\beta 5$ (Huang *et al.*, 2011).

Le récepteur CD36 reconnaît aussi les lipides et les lipoprotéines composants la paroi des bactéries, en particulier ceux des organismes staphylocoques et mycobactériennes, les β -glucanes des espèces fongiques, et les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (Silverstein et Febbraio, 2009). En fait, le récepteur CD36 sert de récepteur pour le parasite de la malaria, *Plasmodium falciparum*, à la surface des globules rouges (Nergiz-Unal *et al.*, 2011). Le CD36 contribue ainsi à la réponse immunitaire, puisqu'il déclenche une réaction qui se traduit par l'internalisation des pathogènes, et ce, indépendamment de l'opsonisation de ceux-ci. (Silverstein et Febbraio, 2009).

1.3.2.2.3.2. Les nombreux ligands exogènes du récepteur CD36

Parmi les peptides ayant été synthétisés et reconnus comme étant des ligands pour le récepteur CD36, il y a le sulfo-N-succinimidyl oléate (SSO) et le sulfo-N-succinimidyl palmitate (SSP). Il s'agit de deux dérivés d'AGLC qui permettent d'inhiber l'absorption des acides gras dans les cellules de plusieurs tissus, comme le tissu adipeux, par leur liaison au récepteur CD36 (Tanaka et Kawamura, 1995; Luiken *et al.*, 1999). Toutefois, plusieurs études

ont permis de déterminer que l'effet inhibiteur du SSO sur l'oxydation des acides gras dans les mitochondries n'est pas spécifique au CD36. En effet, il peut réduire l'activité de la CPT-I chez les mitochondries isolées, autant de souris de type sauvage (WT) C57BL/6 que déficientes en CD36 (Holloway *et al.*, 2009; King *et al.*, 2007). De plus, sur la mitochondrie, le SSO est capable de lier et d'inhiber les complexes I, II et III de la chaîne de transport des électrons (Drahota *et al.*, 2010). Le SSO n'est donc pas vraiment sélectif pour le récepteur CD36, il faut donc interpréter les résultats obtenus avec ces composés avec précaution.

Il y a aussi les peptides de relâche de l'hormone de croissance (GHRP) qui sont des ligands synthétiques du CD36. Il s'agit de peptides ayant été modélisés à partir de la méthionine (Met)-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met). Par contre, comme leur nom l'indique, les GHRP ont été synthétisés non pas pour leur capacité à lier le CD36, mais pour leur capacité à induire la sécrétion de l'hormone de croissance (HC) grâce à leur liaison au récepteur de la ghréline, un récepteur couplé à une protéine G (Bodart *et al.*, 2002). Toutefois, des études de liaison ont permis de constater qu'il y avait des sites de liaison spécifiques pour les GHRP dans des tissus périphériques comme le cœur, les glandes surrénales, les ovaires, les testicules, les poumons et le muscle squelettique où l'HC n'est pas sécrétée (Bodart *et al.*, 2002). Les ligands synthétiques du CD36 tels que les GHRPs se lient au récepteur à un site qui chevauche le site de liaison des LDLox dans la poche hydrophobe du domaine extracellulaire du CD36 (Demers *et al.*, 2004).

En effet, lors de l'utilisation de l'hexaréline, un hexapeptide membre de la famille des GHRP, un effet cardioprotecteur non relié à l'HC, dont il permet la relâche, a été constaté (Locatelli *et al.*, 1999). De plus, un prétraitement chez des rats déficients en GH avec ce

peptide a montré un effet protecteur lors d'une MI/R (De Gennaro Colonna *et al.*, 1997) sans moduler la vasorelaxation dépendante de l'endothélium (Rossoni *et al.*, 1998). Ces effets protecteurs, qui sont indépendants du HC, ont permis de déterminer que l'hexaréline a une action directe sur un récepteur cardiaque spécifique. Des études ont permis de déterminer que le site de liaison de l'hexaréline dans le cœur est le récepteur CD36 (Bodart *et al.*, 2002). Ainsi, l'hexaréline, un analogue 2-méthyl-tryptophane du GHRP-6 (His-D-2-Me-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂), présente une double affinité pour le récepteur de la ghréline, autrefois appelé récepteur des sécrétagogues de l'HC de type 1a (GHS-R1a), et le récepteur CD36 (Proulx *et al.*, 2012). Puisque l'hexaréline lie ces 2 récepteurs, il était moins utile pour étudier le rôle cardioprotecteur du CD36 en tant que tel. Pour pouvoir observer l'effet des ligands sur le récepteur CD36 de façon sélective, des modifications dans la structure du peptide ont été effectuées.

Des études ont permis la synthèse d'un hexapeptide analogue de l'hexaréline, le EP 80317 (Haic-D-2-Me-Trp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) (Haic, 5-amino-1,2,4,5,6,7-tétrahydroazepino [3,2,1-hi]indol-4-one-2-carboxylate), qui est dépourvu de l'activité somatotrope de l'hexaréline dû à la présence d'une D-lysine (D-Lys) en position trois à la place de l'alanine (Ala). Des études ont permis de montrer que le EP 80317 avait une affinité de liaison envers le CD36 similaire à celle de l'hexaréline tout en ayant moins d'affinité pour le récepteur de la ghréline (Demers *et al.*, 2004). Des études réalisées dans notre laboratoire ont montré que le EP 80317 présente des effets cardioprotecteurs dépendants de la présence du récepteur CD36 (Bessi *et al.*, 2012). Le EP 80317, a également démontré des effets anti-inflammatoires et anti-athérosclérotique lors de son utilisation dans le modèle d'athérosclérose. En effet, les niveaux d'ARNm et de protéines inflammatoires plasmatiques et

vasculaires sont réduits chez les souris traitées avec le EP 80317 (Harb *et al.*, 2009). En effet, les niveaux de gp91, iNOS, CCL2 (*c-c- motif ligand 2 chemokine*) et VCAM-1 (*vascular cell adhesion protein 1*) sont réduits lorsque les souris sont nourries avec une diète enrichie en cholestérol et en lipides (HFHC) à partir de l'âge de 4 semaines et traitées quotidiennement avec le EP 80317 ou le véhicule (Harb *et al.*, 2009). De plus, les lésions athérosclérotiques et les niveaux plasmatiques de cholestérol sont réduits chez les souris ayant reçu un traitement quotidien à long terme avec le EP 80317 (Marleau *et al.*, 2005). Par contre, le EP 80317 n'a pas d'effet notable au niveau hépatique, mais exerce des effets sur le tissu adipeux (Bujold *et al.*, 2013). En effet, la réduction de la lipolyse au niveau du tissu adipeux a été rapporté dans Bessi *et al.*, 2012.

D'autres études ont permis la synthèse d'autres ligands du CD36 par l'incorporation d'un résidu aza à la position D-Trp², Ala³, ou Trp⁴ du GHRP-6 pour donner des analogues aza-GHRP-6 ayant une affinité réduite pour le GHS-R1a par un facteur de plus de 100, et une grande affinité pour le récepteur CD36 (Sabatino *et al.*, 2009; Proulx *et al.*, 2012). L'ajout d'un résidu aza au GHRP-6 consiste au remplacement du carbone alpha d'un ou de plusieurs acides aminés par un atome d'azote (Proulx *et al.*, 2011). L'introduction de cette structure dans le squelette du peptide a des répercussions sur les caractéristiques structurales et les propriétés physiques du peptide en favorisant l'adoption d'une conformation stable en coude-bêta (Sabatino *et al.*, 2011).

Une banque d'azapeptides, dans laquelle différents acide aminés dans la séquence du GHRP-6 ont été remplacés par un acide aminé aza correspondant, a été produite afin de trouver une molécule liant le récepteur CD36 et présentant une activité fonctionnelle

indépendante de l'HC (Proulx *et al.*, 2011). Un résidu aza sur le quatrième acide aminé du GHRP-6, la phénylalanine, a engendré [AzaPhe⁴] GHRP-6. Dans un essai de liaison compétitive, il a été démontré que l'ajout de ce groupement aza confère à cet azapeptide une sélectivité beaucoup plus grande pour le CD36 par comparaison au récepteur de la ghréline (Proulx *et al.*, 2011). En effet, cet azapeptide montre une perte d'affinité de 1000 fois envers le récepteur de la ghréline, tel qu'observé par une concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) du GHRP-6 de 3,65 nM comparativement à une CI₅₀ de 2,77 µM pour l'[AzaPhe⁴] GHRP-6 de (Sabatino *et al.*, 2009). Cet azapeptide (Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH₂), appelé CP-3(iv), a donc été utilisé dans les études que nous avons effectué afin de déterminer ses effets cardioprotecteurs par sa liaison avec le récepteur CD36. Le CP-3(iv), bien que plus sélectif pour le CD36 par comparaison au récepteur de la ghréline que le EP 80317 présente une affinité de liaison similaire au CD36 (Bolduc *et al.*, 2011).

1.3.2.2.4. Le rôle du CD36 dans le métabolisme des acides gras et des triglycérides

Tel que discuté brièvement précédemment, le CD36 a un rôle important dans l'internalisation des lipides comme les LDLox, les acides gras non-estérifiés (AGNE) et les AGLC, ce qui lui confère un rôle important dans le métabolisme des lipides. Des études réalisées avec des souris déficientes en récepteur CD36 (CD36^{-/-}) ont permis d'observer que le récepteur CD36 contribue à approximativement 70% de l'internalisation des acides gras dans les cardiomyocytes (Habets *et al.*, 2007). Il a également été démontré, *in vivo*, en utilisant des analogues des acides gras, que l'internalisation de ceux-ci est réduite dans le cœur, le

muscle squelettique et le tissu adipeux chez les souris CD36^{-/-}, de l'ordre de 50 à 80%, 40 à 75% et 60 à 70%, respectivement (Glatz *et al.*, 2010). De plus, dans le cœur isolé au travail, l'oxydation des acides gras est diminuée de 40 à 60% chez les souris CD36^{-/-} comparativement au souris WT. Toutefois, chez les souris surexprimant le récepteur CD36, il y a une augmentation de 400% de l'oxydation des acides gras, comparativement aux souris WT (Glatz *et al.*, 2010). D'autres études impliquant, soit l'inhibition du récepteur CD36 (Luiken *et al.*, 2004), soit sa suppression (Kuang *et al.*, 2004) ont montré que 50-60% de l'absorption des acides gras et de leur oxydation par le cœur est facilité par le récepteur CD36.

1.3.2.2.5. L'interaction du CD36 avec l'APN

Il a été démontré qu'un niveau plasmatique d'APN bas à la suite d'une ischémie-reperfusion du myocarde est prédictif d'évènements cardiaques défavorables dans le futur (Wang *et al.*, 2010). La plupart des effets de l'APN dans le muscle sont médiés par l'APN de forme globulaire et de haut poids moléculaire qui ont une haute affinité pour leur récepteur AdipoR1 qui est très abondant dans le muscle squelettique et cardiaque (Dridi et Taouis, 2009; Yamauchi *et al.*, 2003).

L'APN produite au niveau cardiaque participe à la cardioprotection via des interactions protéines-protéines intracellulaires (Wang *et al.*, 2010). Cette synthèse locale d'APN protège les cardiomyocytes contre les dommages induits lors d'une I/R via l'activation paracrine et autocrine de leur récepteur AdipoR1 en réduisant le stress oxydatif et nitrosatif produit lors de l'I/R (Wang *et al.*, 2010). La suppression du stress oxydatif par l'APN se produit, en partie, par l'inhibition d'iNOS et par la suppression de l'expression de la gp91_{phox} de façon

indépendante de l'AMPK (Matsuda et Shimomura, 2014). L'APN permet de diminuer le stress oxydatif; toutefois, le stress oxydatif diminue également l'expression d'APN. En effet, il a été observé que le niveau sérique d'APN, chez les humains, est inversement corrélé avec le niveau de stress oxydatif systémique (Matsuda et Shimomura, 2014).

Dans les muscles, l'APN régule également à la hausse le récepteur CD36 ainsi que l'acyl-CoA oxydase (ACO) et la protéine de découplage 2 (UCP2) ce qui a comme répercussions une amélioration du catabolisme lipidique et une réduction du contenu en TG. L'ACO et l'UCP2 sont des enzymes impliquées dans la combustion des acides gras et la dissipation de l'énergie, respectivement (Dridi et Taouis, 2009). De plus, les formes de haut poids moléculaire et globulaires de l'APN stimulent la β -oxydation et l'internalisation du glucose dans les muscles squelettiques via la phosphorylation et l'activation d'AMPK. Toutefois, des effets de l'APN sont médiés par PPAR α , un facteur de transcription qui régule l'expression de CD36, de l'ACO et également d'UCP2 (Dridi et Taouis, 2009). En effet, l'augmentation de l'oxydation des acides gras induite par l'APN se produit grâce à l'activation en série d'AMPK et de p38, et ensuite de PPAR α , puisque le p38 phosphoryle et active PPAR α (Dridi et Taouis, 2009). L'APN stimule également la phosphorylation de l'ACC, la combustion des acides gras, l'absorption du glucose et la production du lactate dans les myocytes (Dridi et Taouis, 2009).

1.4. Hypothèse de recherche

Des études antérieures dans notre laboratoire ont montré qu'un prétraitement avec des ligands synthétiques et sélectifs du CD36, tel le EP 80317, exerce un effet cardioprotecteur dans le modèle d'MI/R (Bessi *et al.*, 2012). Les acides gras sont la principale source d'énergie pour le myocarde, notamment lorsque le cœur a subi une MI/R et que les niveaux circulants d'AGNE sont élevés. Le récepteur CD36 a un rôle de facilitateur dans l'internalisation cardiaque de ce substrat. Des études effectuées dans le laboratoire du Dr. Ong ont montré que le CD36 est la cible moléculaire des GHRPs dont le EP 80317. Ces observations nous ont conduit à émettre l'hypothèse de recherche selon laquelle l'administration d'un prétraitement de CP-3(iv) (Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH₂), un ligand sélectif du récepteur CD36, chez des souris mâles C57BL/6, avant de subir une ischémie myocardique de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 48 heures va réduire la taille de la zone myocardique infarctée et empêcher, du moins en partie, la détérioration des fonctions cardiaques du cœur, en réduisant le stress oxydant et en augmentant la production d'adiponectine.

1.5. Objectifs

Cette étude avait pour objectif de documenter 1) l'effet cardioprotecteur du CP-3(iv), un azapeptide se liant spécifiquement au récepteur CD36 et 2) son mécanisme d'action. Selon les recherches antérieures réalisées par notre laboratoire avec d'autres ligands du CD36, il y aurait une réduction significative de l'internalisation globale des AGNE, due à une diminution

de leur concentration plasmatique. Ainsi, le CP-3(iv) pourrait exercer un effet cardioprotecteur liés à des effets sur le métabolisme énergétique du cœur, mais des études préliminaires avec ce peptide ont aussi suggéré des effets de nature anti-inflammatoire et anti-oxydante.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Modèle expérimental

Toutes les procédures expérimentales sur les animaux ont été approuvées par le Comité d'éthique animale institutionnel (Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal), en conformité avec les lignes directrices publiées par le Conseil canadien de protection des animaux. Des souris déficientes en CD36 (CD36^{-/-}) et des souris témoins de type sauvage C57BL/6 (CD36^{+/+}) ont été générées et obtenues de Febbraio *et al.*, 1999. Les souris mâles ont été sevrées à l'âge de 3 semaines et nourries avec une diète normale (Harlan 2918, Indianapolis, États-Unis) et de l'eau ad libitum. Entre 16 à 20 semaines d'âge, les souris ont été séparées en 2 groupes de façon aléatoire selon les traitements pharmacologiques et ont été traitées avec le véhicule (NaCl 0,9%) ou un ligand synthétique du CD36, le CP-3(iv), à une dose quotidienne de 289 nmol/kg (ou 300 µg/kg) par voie sous-cutanée (s.c.) pendant 14 jours pour des études *in vivo*.

2.2. Ligature de l'artère coronaire descendante gauche

L'ischémie-reperfusion du myocarde a été réalisée selon Tarnavski *et al.* (Tarnavski *et al.*, 2003) avec quelques modifications. Brièvement, les souris mâles âgées de 3-4 mois ont été injectées par voie s.c. avec du CP-3(iv) (289 nmol/kg) ou le véhicule (NaCl 0,9%) quotidiennement pendant 14 jours. Les dernières injections ont eu lieu 30 min avant que les souris soient soumises à la ligature (d'une durée de 30 min) de l'artère coronaire descendante gauche ainsi que le jour suivant, 24 heures après la ligature. Avant la chirurgie, les souris ont

reçu une injection par voie intrapéritonéale (i.p.) de buprénorphine (0,05 mg/kg) et ont été anesthésiées dans une chambre d'induction (3% d'isoflurane, 1,5 L/min d'oxygène). Les souris ont ensuite été intubées à l'aide d'un cathéter de calibre 20 (Cathlon®) et ventilées artificiellement avec un volume courant de 220 μ L à une vitesse de 130 coups/min, en utilisant un ventilateur pour rongeurs de type MiniVent (Harvard Apparatus). L'anesthésie a été maintenue avec 1,5-2% d'isoflurane et la température des animaux a été maintenue à l'aide d'un coussin chauffant. La profondeur de l'anesthésie a été monitorée par la disparition des réflexes de retrait. Tout au long de la procédure de chirurgie, l'électrocardiogramme (ECG) de la souris a été enregistré avec 3 électrodes de 25G mises sous-cutanées à l'aide d'un convertisseur analogique-numérique et un logiciel d'acquisition de données (IOX2, EMKA Technologies). Une incision latérale gauche au niveau du troisième espace intercostal a ensuite été réalisée pour exposer l'artère coronaire descendante gauche. Une suture de nylon 8-0 a été faite 1 mm en-dessous de l'oreillette et attachée sur un morceau de tube (Silastic ®; 0,30 mm x 0,64 mm) afin d'éviter d'endommager le cœur lors du retrait de la ligature après 30 minutes d'occlusion. L'ischémie a été confirmée par la pâleur visuelle et la reperfusion par inversion de cet effet. La lidocaïne (6 mg/kg) a été administrée par injection i.p. juste après l'occlusion et 10 min avant la reperfusion pour prévenir les arythmies. La cavité thoracique a été fermée à l'aide d'une suture de soie 6-0 pendant l'occlusion et lors de la reperfusion. Après 6 ou 48 heures de reperfusion, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane et euthanasiées par exsanguination. Un groupe de souris a subi une procédure identique sans la mise en place de la ligature (opérées à blanc ou sham).

2.2.1. Sacrifice

Lors du sacrifice des souris à la fin de la reperfusion cardiaque, le sang a été récolté sur EDTA (4 mM) par ponction cardiaque au niveau du VD. Le plasma a été collecté par centrifugation à 3 200 rpm pendant 5 minutes à température pièce et a été conservé à -80°C pour l'analyse des profils lipidiques et hormonaux. À la suite de la ponction, 10 mL de saline héparinée (10 U/mL) a été injecté dans le VD du cœur afin de perfuser les organes pour en retirer le sang avant de les récolter. Le cœur, le foie, le tissu adipeux épидидymaire ont été récoltés et conservés à -80°C.

2.2.2. Détermination de la taille de l'infarctus

Des souris CD36^{+/+} et CD36^{-/-} ont été réparties en deux groupes de souris ($n \geq 5$), et ont reçu le véhicule ou le CP-3(iv) comme traitement. Après 48 heures de reperfusion, les souris ont subi une anesthésie générale, ont eu la préparation chirurgicale, et un fil de suture a été attaché au niveau du site de ligature précédent. Un millilitre de colorant bleu d'Evans 2% (Sigma-Aldrich) a été injecté dans l'aorte afin de délimiter le tissu non ischémique par la présence du colorant bleu. Le cœur a ensuite excisé, rincé avec du tampon phosphate salin (PBS), les ventricules droit et gauche ont été séparés et congelés rapidement sur glace sèche. Le VG a par la suite été tranché en tranches transversales de 1 mm à l'aide d'une matrice pour couper le cœur des souris (Zivic Instruments). Les tranches ont été incubées dans du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium 1% (TTC 1%) (Sigma-Aldrich) et incubées à 37°C pendant 15

minutes pour déterminer la zone infarctée (IA). Ensuite, les tranches ont été fixées dans de la formaline 10% pendant 12 heures et conservées dans du PBS à 4°C. Pour déterminer la taille de l'infarctus, les tranches mises dans le PBS ont été pesées et photographiées sur leurs deux côtés avec une caméra digitale (Coolpix 4500, Nikon). La zone du VG, la zone à risque (AAR), ainsi que la zone infarctée ont été déterminées par analyse planimétrique à l'aide du logiciel PhotoShop CS3 (Adobe) par une personne ne connaissant pas les traitements reçus. La taille de l'infarctus a été calculée comme suit: $(A1 \times W1) + (A2 \times W2) + (A3 \times W3) + (A4 \times W4) + (A5 \times W5)$, où A est le pourcentage de IA obtenu par planimétrie des tranches 1-5 et W est le poids des mêmes tranches numérotées de 1 à 5 (Michael *et al.*, 1995; Bohl *et al.*, 2009).

2.3. Perfusion de cœurs isolés en mode Langendorff

Pour les études *ex vivo* en mode Langendorff, les souris ont été séparées en 2 groupes et les cœurs isolés des souris ont été perfusés soit avec le véhicule (NaCl 0,9%) ou le CP-3(iv) à une concentration de 10^{-6} M.

Des souris mâles C57BL/6 ou CD36^{-/-} ont été anesthésiées par voie i.p. avec un mélange d'hydrate de chloral (600 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) et héparinisées (5000 U/kg, i.p.) 15 minutes avant l'intervention chirurgicale. Les cœurs des souris ont été excisés et immédiatement immergés dans du tampon Krebs-Henseleit bicarbonate (KHB) glacé contenant 118 mM de NaCl, 25 mM de NaHCO₃, 4,7 mM de KCl, 1,2 mM de KH₂PO₄, 2,5

mM de CaCl_2 1,2 mM de MgSO_4 , 11 mM de glucose, 8 nM d'insuline, 1,5 mM de lactate, 0,2 mM de pyruvate, 0,5 mM d'EDTA et 1,2 mM de palmitate lié à 2% d'albumine sérique bovine (BSA) sans acide gras. L'aorte a ensuite été canulée avec une canule de calibre 18 et les morceaux de tissus (péricarde, poumon, trachée, etc) ont été retirés. Le cœur a été soumis à une perfusion rétrograde (60 mm Hg) avec une solution de KHB (gazée avec 95% d' O_2 et 5 % de CO_2). Les cœurs ont été soumis à 30 minutes de perfusion aérobie suivie par 40 minutes d'ischémie à faible débit (10% du débit pré-ischémique), puis à 30 minutes de reperfusion pendant laquelle le cœur reprend le débit par lui-même. Le peptide a été ajouté à l'aide d'un pousse-seringue à travers un orifice d'injection au-dessus de la canule de l'aorte à la reperfusion. La fonction contractile a été contrôlée de façon continue à l'aide d'un ballon rempli de fluide inséré dans le VG. L'extrémité distale du cathéter à ballon a été reliée à un capteur de pression pour mesurer la pression intra-ventriculaire et les dérivées de la pression développée ($\pm \text{dP/dt}$). Avant l'expérience, le capteur de pression a été calibré au moyen d'un manomètre à mercure. Les mesures de pression ont été enregistrées avec le PowerLab/8sp (ADInstruments) et le logiciel (Tableau 5.0.1, ADInstruments). L'effluent coronarien a été recueilli à des intervalles de 2 minutes dans les 10 premières minutes et par la suite à toutes les 5 minutes pour la mesure du débit coronaire et la détermination du niveau de LDH (lactate déshydrogénase) et d'APN. À la fin de la reperfusion, les cœurs ont été immédiatement congelés dans de la glace sèche et stockés à -80°C .

2.4. Fonction cardiaque *in vivo*

Des souris WT ont été réparties en quatre groupes ($n = 8$). Il y avait des souris sham et des souris ayant subi une MI/R de 48 heures traitées avec le CP-3(iv) ou le NaCl 0,9%. Lors du sacrifice des souris, celles-ci ont été anesthésiées et mises sous ventilateur pareillement à la première intervention. Une thoracotomie a été de nouveau produite et un cathéter de conductance miniature 1.4 Fr PV (SPR 839, Millar Instruments) a été inséré dans l'apex du ventricule gauche de la souris et a été connecté au système de transduction (Millar) afin de générer des courbes pression-volume comme il a été décrit dans Chua *et al*, 2009.

2.5. Méthodes d'analyse

2.5.1. Concentrations sanguines de glucose et de lactate

Pendant l'ischémie-reperfusion du myocarde *in vivo*, la concentration sanguine de glucose a été mesurée à l'aide d'un glucomètre ACCU-CHEK Aviva (Roche Diagnostics, Laval, Qc) avant la ligature chez la souris anesthésiée afin d'avoir la concentration basale de glucose, et lors de son sacrifice à la fin de la reperfusion.

Pour ce qui est de la concentration sanguine de lactate, celle-ci a été mesurée à l'aide d'un appareil de mesure à bandelettes *Blood Lactate Test Meter Lactate Pro* (Arkray Inc., Kyoto, Japon). La mesure de la concentration de lactate a seulement eu lieu 5 minutes après le retrait de la ligature.

2.5.2. Concentration plasmatique de troponine I cardiaque

La concentration plasmatique de troponine I cardiaque (TnIc) des souris a été mesurée à l'aide du kit *Elisa High Sensitivity Mouse Cardiac Troponin-I* (Life Diagnostic, West Chester, PA) et selon les instructions incluses dans celui-ci. Brièvement, les échantillons de plasma ont été dilués 1:4 dans le diluant. Dans une plaque de 96 puits, 100 µL d'anticorps anti-TnIc conjugué à la peroxydase de raifort ont été mis et ensuite 100 µL d'échantillons dilués ou de standards (solutions d'étalonnage) ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été incubée à température pièce pendant une heure sous légère agitation et ensuite lavée 6 fois avec la solution de rinçage. 100 µL de tétraméthylbenzidine (TMB) (substrat chromophore) ont été ajoutés dans chaque puits et la plaque a été incubée de nouveau à température pièce pendant 20 minutes sous légère agitation. Après l'incubation, la réaction a été arrêtée avec l'ajout de 100 µL de la solution stop (HCl 1N) dans les puits. L'absorbance a ensuite été lue à 450 nm et la concentration de TnIc a été calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage obtenue à partir de dilutions du standard de TnIc.

2.5.3. Concentrations plasmatiques d'adiponectine totale et de haut poids moléculaire

Les concentrations plasmatiques d'APN totale et de haut poids moléculaire ont été mesurées à l'aide du kit *Elisa Adiponectin (Mouse) Total, HMW* (Alpco Immunoassays,

Salem, NH) selon les instructions du fabricant. Les concentrations plasmatiques d'APN ont été mesurées à partir du plasma provenant du sang prélevé lors du sacrifice de l'animal à la suite de l'MI/R. Brièvement, les échantillons de plasma ont été dilués 1:81 dans deux séries de tubes avec le tampon de protéase et le tampon de prétraitement pour permettre le dosage de l'APN totale et avec la solution de protéases contre l'APN de faible et moyen poids moléculaire et le tampon de prétraitement pour le dosage de l'HMW (5 µL; 50 µL; 350 µL). Ces échantillons sont dilués de nouveau 1:8181 avec le tampon de dilution. Dans la plaque de 96 puits, 50 µL de standard ou d'échantillons dilués ont été ajoutés dans les puits et ensuite la plaque a été incubée pendant une heure à température pièce. La plaque a été lavée 3 fois avec la solution de rinçage. Dans chaque puits, 50 µL de biotine conjuguée à l'anticorps polyclonal anti-APN murin ont été ajoutés et la plaque a été incubée pendant une heure à température pièce. La plaque a été lavée 3 fois avec la solution de rinçage, 50 µL de streptavidine conjuguée à la peroxydase de raifort ont été ajoutés dans chaque puits et la plaque a été incubée pendant 30 minutes à température pièce. Après l'incubation, la plaque a été lavée 3 fois avec la solution de rinçage, et 50 µL du substrat (O-phénylènediamine), reconstitué juste avant son utilisation, ont été ajoutés dans chaque puits et la plaque a été incubée pendant 10 minutes à température pièce. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 50 µL de la solution stop dans chaque puits. L'absorbance a été ensuite lue à 492 nm et les concentrations d'APN totale et d'APN HWM ont été obtenues à l'aide de la courbe d'étalonnage faite avec le standard d'APN recombinant murin.

2.5.4. Chimiluminescence

2.5.4.1. Dans le sang

Le sang, lors du sacrifice de la souris, a été prélevé sous héparine et gardé sur glace jusqu'à son utilisation. 25 μ L de sang a été ajouté à 225 μ L de solution DMEM 50 mM contenant 50 mM d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES). De ce mélange, 200 μ L ont été mis dans une cuvette contenant un barreau magnétique qui a été placé dans l'agrégomètre optique (Lumi-aggregometer, ChronoLog Corporation, USA) pour y être incubés à 37°C pendant 10 minutes. Après l'incubation, 100 μ L de luminol ont été ajoutés au mélange et 5 minutes plus tard 100 μ L de zymosan opsonisé ont également été ajoutés afin de stimuler les phagocytes sanguins (phagocytose). Dix à 15 minutes plus tard, l'enregistrement de la chimiluminescence émise par le sang est arrêté, et l'amplitude maximale de la réaction correspondant à la génération de ROS a été mesurée.

2.5.4.2. Dans l'homogénat cardiaque

Le cœur a été homogénéisé dans du PBS et ensuite centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot a été resuspendu dans 75 μ L de Krebs-HEPES (120 mM de NaCl, 4,7 mM de KCl, 2,5 mM de CaCl₂, 1,2 mM de MgSO₄, 1,2 mM de KH₂PO₄, 2,5 mM de NaHCO₃, 20 mM d'HEPES et 11,1 mM de glucose) et séparé en deux tubes placés à -80°C jusqu'au dosage de la chimiluminescence en duplicata.

Lors de l'essai, 370 μL de solution Krebs-HEPES, 5 μL de diméthylsulfoxyde (DMSO), 25 μL de l'homogénat et 100 μL de lucigénine 25 μM ont été mis dans la cuvette avec un barreau magnétique dans l'agrégomètre pour y être incubés à 37°C pendant 5 minutes. Par la suite, 10 μL de NADPH 15 mM ont été ajoutés. Lorsque le plateau de la réaction a été obtenu et que la chimioluminescence émise diminue, la lecture est arrêtée et l'amplitude mesurée.

2.5.5. Isolation des fibres myocardiques

L'isolation et la perméabilisation des fibres myocardiques ont été réalisées selon Saks *et al.* (Saks *et al.*, 1998). Lors du sacrifice de la souris, le cœur a été prélevé rapidement et le ventricule gauche mis dans du PBS afin d'être disséqué sous un microscope binoculaire à l'aide de pinces très fines et pointues. Au cours de la dissection, le cœur a été gardé dans une solution A contenant CaK₂EGTA 2,77 mM, K₂EGTA 7,23 mM, MgCl₂ 6,56 mM, dithithréitol 0,5 mM, K-MES 50 mM, imidazole 20 mM, taurine 20 mM, Na₂ATP 5,3 mM, phosphocréatine 15 mM à pH 7,3 conservée à 4°C. Lorsque les fibres ont été isolées, elles ont été mises dans la même solution contenant également de la saponine (50 $\mu\text{g/mL}$) et mises sur glace et sous agitation pendant 30 minutes afin de permettre la perméabilisation des fibres. Par la suite, les fibres ont été transférées dans un nouvel aliquot de la même solution et mises sur glace pendant 5 minutes. Les fibres obtenues ont ensuite été séparées en deux échantillons afin d'effectuer deux essais sur celles-ci; soit la mesure de la production de ROS et le temps d'ouverture du mPTP.

2.5.5.1. Mesure de la production de ROS dans les fibres myocardiques

Pour effectuer cet essai, les fibres ont été mises sur glace pendant 5 minutes dans une solution Z contenant du K-MES (110 mM, KCl 35 mM, EGTA 1 mM, $MgCl_2$ 3 mM, K_2HPO_4 10 mM et de la BSA 0,5 mM à pH 7,3) conservée à 4°C et ensuite pendant 10 autres minutes dans la même solution fraîche. La portion de fibres qui a été conservée pour effectuer cet essai a été séparée en trois afin d'effectuer la mesure de la production de ROS en triplicata pour chacun des cœurs utilisés.

Dans une cuvette de quartz contenant un barreau magnétique, 750 μ L de la solution Z à 37°C, 7,5 μ L d'*Amplex Red* 100 μ M et 1,5 μ L de HRP 1,2 U/mL ont été mis et la cuvette a été installée dans un spectrofluorimètre préalablement chauffé à 37°C. L'acquisition de la fluorescence a, par la suite, débutée. (longueurs d'onde excitation et émission 563; 587)

À toutes les 2-3 minutes un substrat est ajouté dans la cuvette. Pour débiter, un «ballot» de fibres a été ajouté dans la cuvette. Par la suite, 7,5 μ L de glutamate 5 mM, de succinate 500 mM et d'ADP 100 mM ont été ajoutés successivement. Pour finir, 15 μ L d'antimycine A 8 μ M ont été ajoutés.

L'acquisition de la fluorescence a été effectuée tout le long de l'ajout des différents substrats afin d'observer la fluorescence émise, corrélée avec la production de ROS. La pente de la courbe entre chacun des ajouts a été calculée pour déterminer la quantité de ROS produits. À la fin de chaque acquisition, les fibres contenues dans les cuvettes ont été conservées afin de déterminer la quantité de fibres utilisée lors de chaque essai. Celles-ci sont pesées afin d'avoir leur poids sec.

2.5.5.2. Mesure de l'ouverture du mPTP

Pour effectuer cet essai, les fibres ont été mises sur glace pendant 5 minutes dans une solution C contenant de l'acide 2-(N-Morpholino)ethanesulfonique (K-MES) 80 mM, HEPES 50 mM, taurine 20 mM, dithithréitol 0,5 mM, $MgCl_2$ 10 mM et ATP 10 mM à pH 7,3 conservée à 4°C et ensuite pendant 10 autres minutes dans la même solution fraîche. Par la suite, les fibres ont été mises pendant 30 minutes dans de la solution D contenant du KCl 800 mM, de l'HEPES 50 mM, de la taurine 20 mM, du dithithréitol 0,5 mM, du $MgCl_2$ 10 mM et de l'ATP 10 mM à pH 7,3 conservée à 4°C pour permettre la fantômisatation des fibres. Pour finir la préparation des fibres, celles-ci ont été mises sur glace 5 minutes dans une solution contenant du sucrose 250 mM, de l'EGTA-Tris (2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol) 5 μ M et du Tris-MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonique) 10 mM à pH 7,3 à 4°C et ensuite pendant 10 autres minutes dans la même solution fraîche. La portion de fibres qui a été conservée pour effectuer cet essai a été séparée en trois aliquots afin d'effectuer la mesure de l'ouverture du mPTP en triplicata pour chacun des cœurs utilisés.

Dans une cuvette de quartz contenant un barreau magnétique, 750 μ L de la solution de sucrose à 37°C, 7,5 μ L de succinate 500 mM, 7,5 μ L de phosphate inorganique (Pi) 10 mM, 3,75 μ L d'oligomycine 100 μ M et 3,75 μ L de calcium green 1 μ M ont été ajoutés. La cuvette a été installée dans un spectrofluorimètre préalablement chauffé à 37°C. L'acquisition de la fluorescence a, par la suite, débutée (longueurs d'onde excitation et émission 505; 535). Pour débiter l'essai, le niveau de fluorescence basal de la cuvette doit être ajusté, si nécessaire, en ajoutant soit de l'EGTA 10 mM pour la diminuer ou du calcium 5 mM pour l'augmenter. Le niveau basal devant être entre 100-150 UA (unité arbitraire). Les fibres ont, par la suite, été

ajoutées dans la cuvette. On a obtenu, par l'ajout de 5 μ L de calcium 5 mM, une fluorescence très élevée. Celle-ci a diminué au fur et à mesure de l'absorption du calcium par les mitochondries et l'ouverture du mPTP a été observée lors de la remontée de la fluorescence représentant la sortie du calcium de la mitochondrie par le mPTP.

À la fin de chaque acquisition, les fibres contenues dans les cuvettes ont été conservées afin de déterminer la quantité de fibres utilisées lors de chaque essai. Celles-ci sont pesées afin d'avoir leur poids sec. Le temps d'ouverture a été calculé en faisant la différence entre le moment de l'ouverture du pore (lors de la remonter de la courbe) et le moment de l'ajout du Ca^{2+} . La quantité de calcium absorbée a, quant à elle, été calculé en faisant la différence entre la quantité d'UA obtenue lors de l'ouverture du pore et lors de l'ajout du calcium.

2.5.6. Activité de l'aconitase

Les VG des souris ayant subi une ischémie-reperfusion et ayant été prétraitées ont été homogénéisés sur glace à l'aide d'un potter dans une solution contenant 225 mM de mannitol, 75 mM de sucrose, 0,5% de BSA, 0,5 mM d'EGTA et 30 mM de Tris HCl à pH 7,4 préalablement azotée pendant 10 minutes. L'homogénat a ensuite été centrifugé à 16 000 g pendant 15 minutes à 4°C et le culot a été conservé à -80°C.

Lors du dosage de l'aconitase, le culot a été resuspendu dans un tampon d'extraction (Tris HCl 0,1 mM et d'acide tricarballoylique 15 mM) à pH 7,8 préalablement azoté pendant 10 minutes. Le dosage protéique a ensuite été effectué et les homogénats dilués avec du triton-X-100 pour obtenir une concentration protéique de 1 mg/mL afin d'effectuer le dosage de

l'activité de l'aconitase. Après 1 heure d'incubation sur glace, les échantillons ont été soniqués pendant 20 minutes à 4 °C.

Pour la mesure de l'activité, 200 µL de réactif (0,5 mM de NADP, 5 mM de solution citrate (citrate de sodium 10 mM et triéthanolamine 160 mM), MgCl₂ 0,5 mM et isocitrate déshydrogénase 1 U/mL ont été mis dans les puits dans lesquels 16 µL d'échantillon ont été ajoutés. La plaque a été ensuite lue à 37°C et l'acquisition des données d'absorbance pour déterminer le profil cinétique a été effectuée à une longueur d'onde de 340 nm pendant 30 minutes avec des lectures à toutes les 60 secondes. Le taux d'augmentation de la pente de la longueur d'onde A₃₄₀ par minute a été déterminé et la concentration d'aconitase (mU/mg de protéines) a été calculée avec la formule : $mU = ((A_{340}Net/min) / \epsilon * c) * d$, où l'absorbance Net est l'absorbance de l'échantillon moins celle du blanc, ϵ est le coefficient d'extinction molaire pour le NADP (6220 M⁻¹ cm⁻¹), c est le coefficient de correction de la température (2.4435) et d est le facteur de dilution (12,5).

2.5.7. Activité des caspases 3 et 9

Les VG des souris ayant subies une ischémie-reperfusion et ayant été prétraitées sont homogénéisés dans une solution d'isolation de la fraction cytosolique totale (TCF) contenant de l'HEPES 20 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, DTT (dithiothréitol) 1 mM, Triton-X-100 0,1% et de glycérol 20%, à l'aide d'un polytron. L'homogénat a ensuite été centrifugé à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant a été conservé (*nuclei-free total cytosolic protein*

fraction) à -80°C. Le dosage protéique a été effectué pour obtenir une concentration protéique de 5,0 µg/µL de l'homogénat afin d'effectuer le dosage de l'activité des caspases.

À l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence de plaques à 96 puits (Molecular Devices, Specta Max), 50 µL d'*assay buffer* (Pipes 50 mM, d'EDTA 0,1 mM, DTT 10 mM et de glycérol 10 %) ont été ajoutés à 50 µL du surnageant. Par la suite, 1 µL de substrat spécifique d'une caspase (Caspase 3: Ac-DEVD-AFC ou Caspase 9 Ac-LEHD-AFC) a été ajouté rapidement. La fluorescence émise (RFU) a été par la suite lue pendant une heure à l'aide du lecteur de plaques à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 400 nm et 505 nm, respectivement, à 37°C. La pente de la courbe cinétique obtenue représente l'activité caspase (RFU/s).

2.6. Analyse statistique

Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm SEM. Les comparaisons entre les groupes, sauf pour les résultats du cœur isolé en mode Langendorff, ont été réalisées sur des données normalement distribuées à l'aide du *t*-test non apparié ou une ANOVA à 1 facteur (*one-way ANOVA*) suivie par de multiples comparaisons par paires à l'aide du test de Newman-Keuls avec le logiciel GraphPad PRISM4. Pour les résultats obtenus avec le cœur isolé, l'analyse a été réalisée avec une ANOVA à 2 facteurs (*two-way ANOVA*) suivie par des comparaisons par paires à l'aide du test de Bonferroni (post-test) avec le même logiciel. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $P < 0,05$.

3. RÉSULTATS

3.1. Effet du CP-3(iv) sur les dommages induits lors d'une ischémie-reperfusion du myocarde

Lors de l'étude de planimétrie, des souris WT et CD36-/- ont été utilisées et chaque lignée a été divisée en 2 groupes de souris. Les souris ont été prétraitées avec le CP-3(iv) (289 nmol/kg) ou le NaCl 0,9% pour une durée de 14 jours après quoi elles ont été soumises à une ischémie du myocarde de 30 minutes à l'aide de la ligature de l'artère coronaire descendante gauche (figure 1A). À la suite du retrait de la ligature, le cœur a été reperfusé pendant 48 heures. Les souris WT ayant reçu un prétraitement avec l'azapeptide ont montré une diminution de la taille de leur infarctus de l'ordre de 54% ($P < 0,001$) comparativement aux souris témoins (figures 1B et 1D). Par contre, chez les souris CD36-/-, cette réduction n'a pas été observée (figure 2). De plus, la diminution de la taille de l'infarctus chez les souris traitées avec le CP-3(iv) est corrélée avec une diminution de la concentration plasmatique de troponine I cardiaque (Figure 1C).

3.2. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux sanguins de lactate et de glucose

La diminution de la taille de l'infarctus, chez les souris WT, lors de l'ischémie-reperfusion a été accompagnée d'une diminution du niveau de lactate sanguin de 17% ($P < 0,05$), 5 minutes après le début de la reperfusion, chez les souris prétraitées avec le CP-3(iv) comparativement aux souris témoins (figure 3A). Toutefois, la glycémie de ces souris ne diffère pas, et ce, avant l'ischémie et après la reperfusion (figure 3B).

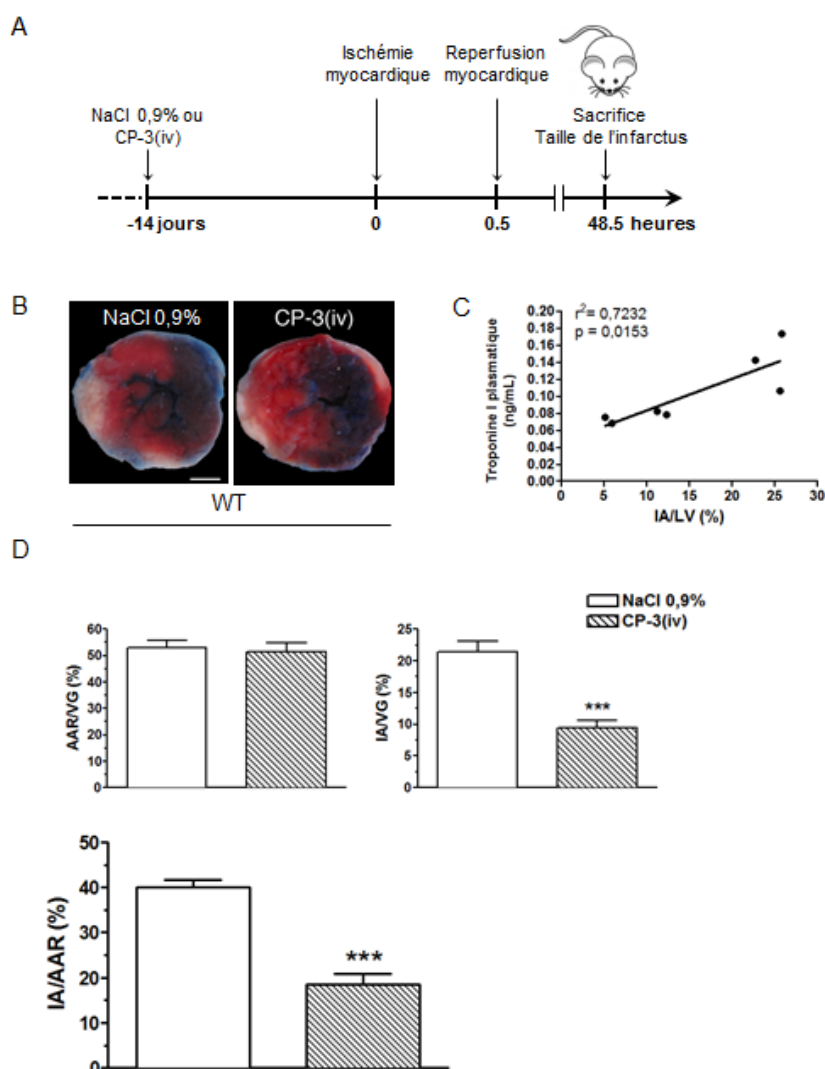


Figure 1. Effet du CP-3(iv) sur la taille de l'infarctus à la suite d'une ischémie de 30 minutes suivie de 48 heures de reperfusion chez les souris WT.

(A) Représentation schématique du protocole expérimental montrant la durée de l'ischémie-reperfusion du myocarde chez des souris prétraitées avec le CP-3(iv) à 289 nmol/kg ou avec le véhicule. (B) Photomicrographies représentatives d'une section du VG montrant la zone à risque (coloration rouge incluant le tissu infarcté (blanc)), ainsi que la région non ischémique (coloration bleue) (C) Corrélation entre la taille de l'infarctus et le niveau plasmatique de cTnI. (D) Histogramme montrant l'effet du prétraitement CP-3(iv) sur la taille de l'infarctus. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 6-8 souris WT par groupe. *** $P < 0,001$ vs. NaCl 0,9%. AAR, zone à risque; cTnI, troponine I cardiaque; IA, zone infarctée; VG, ventricule gauche.

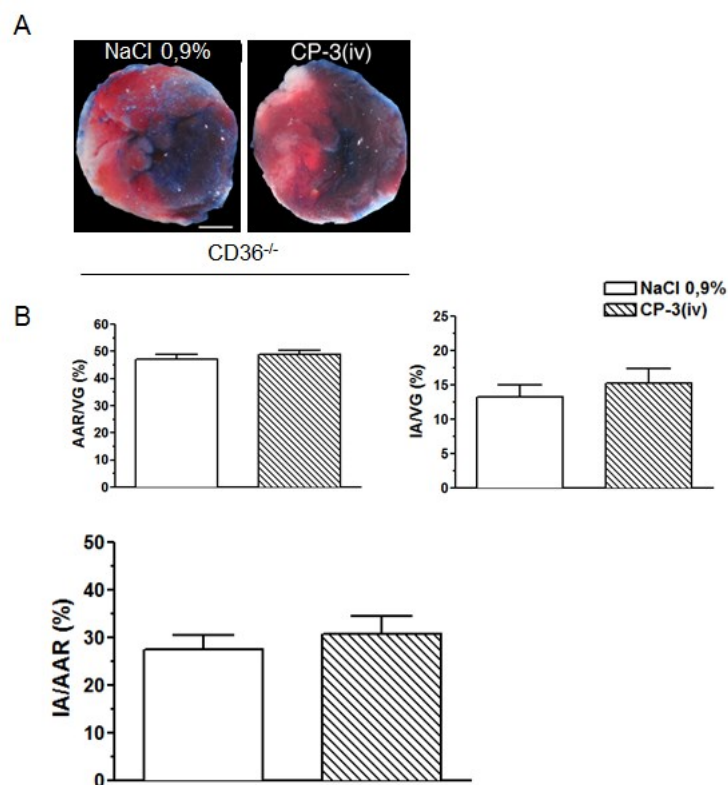


Figure 2. Effet du CP-3(iv) sur la taille de l'infarctus à la suite d'une ischémie de 30 minutes suivie de 48 heures de reperfusion chez les souris déficientes en CD36.

(A) Photomicrographies représentatives d'une section du VG montrant la zone à risque (coloration rouge incluant le tissu infarcté (blanc)) et la zone non ischémique (coloration bleue).

(B) Histogramme montrant l'effet du prétraitement CP-3(iv) sur la taille de l'infarctus. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 4 souris par groupe (CD36^{-/-}). AAR, zone à risque; IA, zone infarctée.

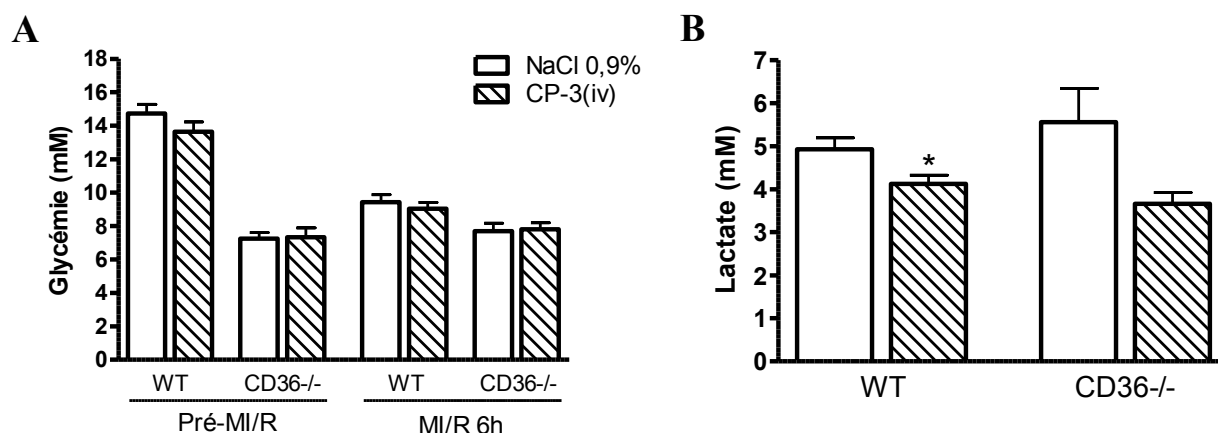


Figure 3. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux sanguins de lactate et de glucose à 6 heures de reperfusion chez les souris WT et CD36^{-/-}.

(A) Niveaux sanguins de lactate des souris 5 minutes après l'ischémie 30 minutes. (B) Niveaux sanguins de glucose des souris avant qu'elles ne soient soumises à une ischémie de 30 minutes et après 6 heures de reperfusion. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 5-8 souris par groupe. * $P < 0,05$ vs. NaCl 0,9%. MI/R, ischémie-reperfusion du myocarde.

3.3. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux plasmatiques d'AGNE, de TG et d'APN

Pour ce qui est des niveaux plasmatiques de TG et d'AGNE, ils n'ont pas été modulés de façon significative par le prétraitement chez les souris WT, après une ischémie de 30 minutes et une reperfusion de 6 heures (Figure 4A et B).

Toutefois, les niveaux plasmatiques d'APN de haut poids moléculaire ont montré une augmentation de l'ordre de 37% ($P < 0,05$) chez les souris prétraitées avec l'azapeptide comparativement aux souris ayant reçu le NaCl 0,9%, à 6 heures de reperfusion (figure 5). Par contre, à 48 heures de reperfusion, les niveaux d'APN de haut poids moléculaire ne sont pas différents entre les deux groupes de souris (figure 5). Les niveaux d'APN, chez les souris CD36^{-/-} ayant subi la MI/R 6 ou 48 heures, ne sont pas différents entre les 2 groupes de traitements.

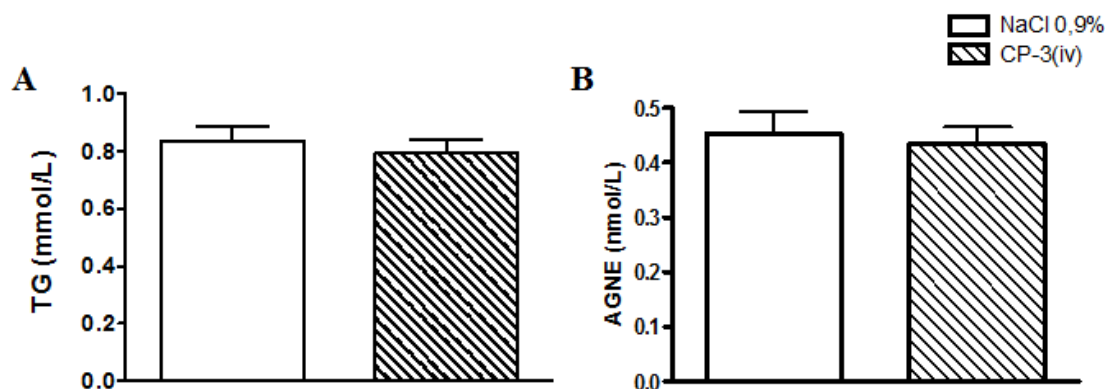


Figure 4. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux plasmatiques de TG et de AGNE à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.

Les niveaux plasmatiques de triglycérides (A) et d'acides gras non-estérifiés (B) des souris WT ayant subi une ischémie de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 6 heures. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 9 souris par groupe. AGNE, acide gras non-estérifié; TG, triglycéride.

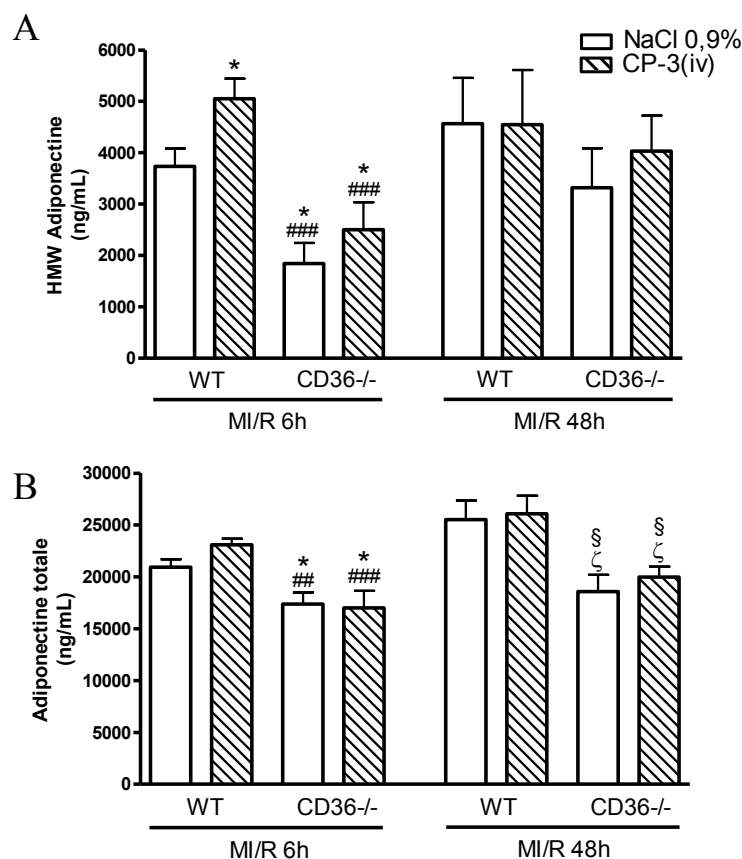


Figure 5. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux plasmatiques d'APN de haut poids moléculaire et totale chez les souris WT et CD36^{-/-} après 6 et 48 heures de reperfusion.

Les niveaux plasmatiques d'APN de haut poids moléculaire (A) ou totale (B) chez les souris WT et CD36^{-/-} ayant subi une ischémie de 30 minutes et une reperfusion de 6 ou 48 heures. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 6-7, 12-14 et 8 souris par groupe chez les CD36^{-/-} 6 h, WT 6h et WT et CD36^{-/-} 48 h, respectivement. * $P < 0,05$ vs. NaCl 0,9% des souris WT 6h; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs. CP-3(iv) des souris WT 6h; § $P < 0,05$ vs. NaCl 0,9% des souris WT 48h; § $P < 0,05$ vs. CP-3(iv) des souris WT 48h. HMW, haut poids moléculaire; MI/R, ischémie-reperfusion du myocarde.

3.4. Effet du CP-3(iv) sur la production de ROS

Les niveaux de ROS produits dans l'homogénat cardiaque des souris WT ayant subi l'ischémie-reperfusion du myocarde ont été diminués de 51% ($P < 0,01$) lors du prétraitement avec le CP-3(iv) (figure 6A). La production de ROS dans le sang, quant à elle, a montré seulement une tendance vers la diminution (figure 6B), mais il existe une bonne corrélation entre les ROS dans l'homogénat et dans le sang chez les souris prétraitées avec l'azapeptide comparativement aux souris ayant reçu le NaCl 0,9% à 6 heures de reperfusion (figure 6C).

La production de ROS a aussi été quantifiée dans des fibres cardiaques isolées de souris WT (ROS mitochondriaux). En présence de succinate, une diminution de la production de ROS de 20% ($P < 0,05$) a été observée (figure 7).

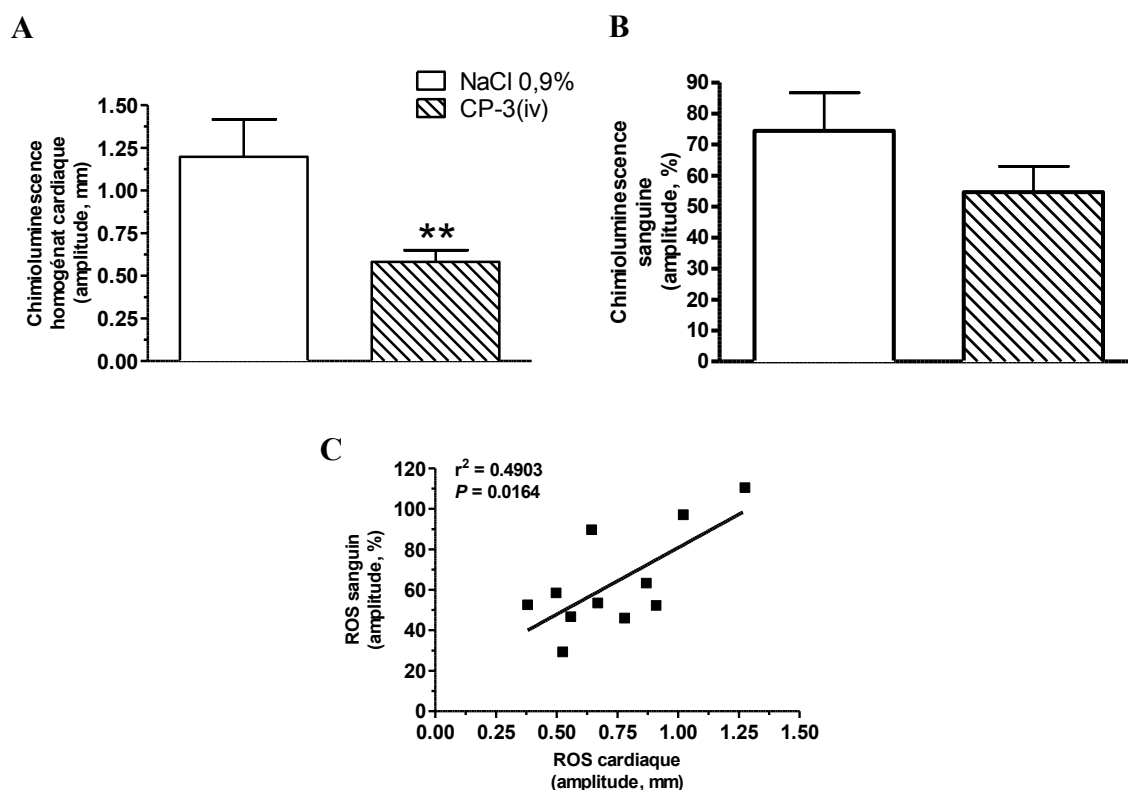


Figure 6. Effet du CP-3(iv) sur les niveaux sanguin et cardiaque de ROS à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.

La production de ROS dans l'homogénat cardiaque (A) et dans le sang (B) de souris ayant subi une ischémie de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 6 heures. (C) Corrélation entre les niveaux de ROS dans l'homogénat cardiaque et dans le sang des souris. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 8 souris par groupe. ** $P < 0,01$ vs. NaCl 0,9%. ROS, espèces réactives de l'oxygène.



Figure 7. Effet du CP-3(iv) sur la production de ROS mitochondriaux à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.

La production de ROS par les fibres isolées de cœur de souris ayant subi une ischémie de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 6 heures lors de l'ajout consécutif de différents substrats. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 12-14 souris par groupe. * $P < 0,05$ vs. NaCl 0,9%. ROS, espèces réactives de l'oxygène.

3.5. Effet du CP-3(iv) sur l'ouverture du mPTP

Le temps d'ouverture du mPTP et la quantité de calcium absorbée ont été mesurés dans les fibres isolées de cœur, mais nos résultats n'ont pas montré d'effet sur le temps d'ouverture du pore (figure 8A) ou de la concentration du calcium (figure 8B) chez les souris traitées avec l'azapeptide.

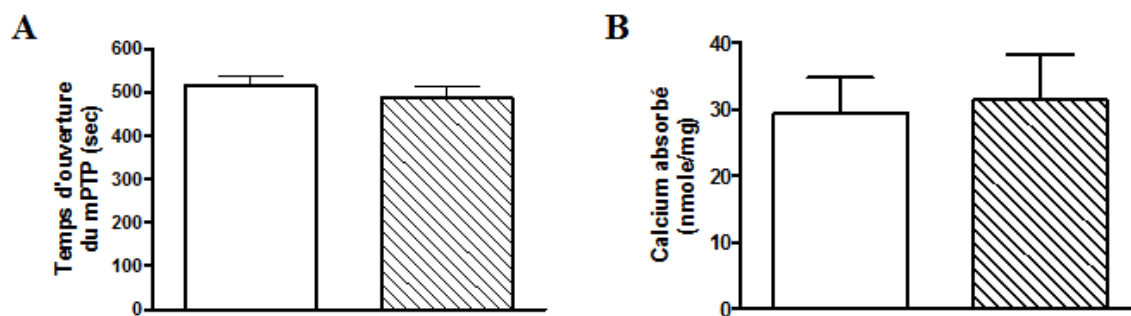


Figure 8. Effet du CP-3(iv) sur le temps d'ouverture du mPTP et l'absorption du calcium par les mitochondries à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.

(A) Le temps d'ouverture du mPTP et (B) la quantité de calcium absorbée dans les fibres isolées des cœurs de souris soumises à une ischémie de 30 minutes suivie de 6 heures de reperfusion. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 12-13 souris par groupe.

3.6. Effet du CP-3(iv) sur l'activité de l'aconitase et des caspases

L'activité de l'aconitase, une enzyme du cycle de Krebs, sensible au ROS, a été mesurée. Chez les souris WT prétraitées avec l'azapeptide, l'activité de l'enzyme a été augmentée de 33 % comparativement au véhicule (figure 9).

Pour ce qui est des enzymes caspase 3 et caspase 9, deux enzymes impliquées dans le processus d'apoptose des cellules, l'activité de la caspase 3 a montré une diminution de 14% ($P < 0,05$) tandis que celle de la caspase 9 a montré une tendance à diminuer lors de l'utilisation d'un prétraitement avec l'azapeptide après d'une ischémie-reperfusion du myocarde de 6 heures (figure 9).

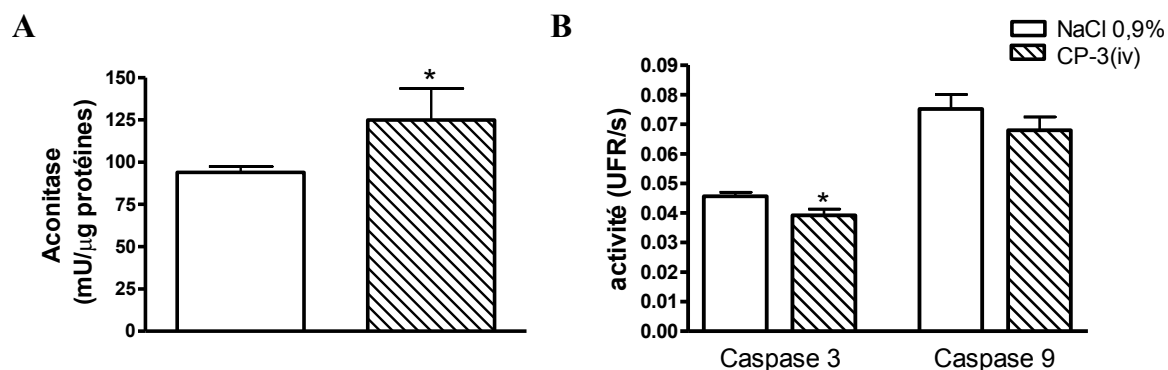


Figure 9. Effet du CP-3(iv) sur l'activité de l'aconitase et des caspases 3 et 9 à 6 heures de reperfusion chez les souris WT.

L'activité de (A) l'aconitase et des (B) caspases 3 et 9 dans l'homogénat cardiaque de souris ayant subi une ischémie de 30 minutes suivie de 6 heures de reperfusion. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 5-7 souris par groupe. UFR, unité de fluorescence relative. * $P < 0,05$ vs. NaCl 0,9%.

3.7. Effet du CP-3(iv) sur les fonctions cardiaques

3.7.1. In vivo

Nous avons vérifié si le travail du cœur était affecté par le traitement et nous avons observé que les cœurs des souris WT préalablement traitées avec le CP-3(iv) ont une fonction cardiaque améliorée post I/R. En revanche, la fonction cardiaque des souris sham, ayant été prétraitées avec le véhicule ou le CP-3(iv) n'a pas été affectée par le traitement puisqu'il n'y a aucune différence observable chez les deux groupes de souris.

Les effets cardioprotecteurs ont été traduits par une augmentation du volume d'éjection systolique et du débit cardiaque de 36% et 40%, respectivement ; la résistance périphérique totale, quant à elle, a été diminuée de 29% chez les souris ayant reçu le prétraitement avec l'azapeptide précédemment à l'ischémie-reperfusion de 48 heures comparativement au souris ayant reçu le NaCl 0,9% avant la chirurgie (tableau 1).

Tableau 1. Effet du CP-3(iv) sur la fonction cardiaque chez les souris WT ayant subi une ischémie de 30 minutes suivi de 48 heures de reperfusion.

	48 heures			
	Sham		I/R	
	NaCl 0,9%	CP-3(iv)	NaCl 0,9%	CP-3(iv)
<i>n</i>	7	7	7	6
poids, g	28±1	28±1	28±1	29±1
longueur du tibia, mm	18±0	18±0	18±0	18±0
FC, b.p.m.	439±11	422±14	448±16	481±17
VES, µL	17±1	16±1	11±1 ^{***,###}	15±1 ^{λλ}
DC, mL/min	7±0	7±0	5±0 ^{***,##}	7±1 ^{λλ}
FE, %	73±4	83±2 [*]	66±6	73±6
Ea, mmHg/µL	5.5±0.3	5.9±0.5	7.2±0.6	5.7±0.3
RPT, mmHg min/mL	13±1	15±1	17±1	12±1 ^λ
Pes, mmHg	95±4	101±5	80±8	84±7

La fonction cardiaque *in vivo* a été mesurée à l'aide d'un cathéter de conductance Millar. FC, fréquence cardiaque; VES, volume d'éjection systolique; DC, débit cardiaque; FE, fraction d'éjection; Ea, élastance artérielle; RPT, résistance périphérique totale (Pes/DC); Pes, *end-systolic pressure*. Les valeurs représentent la moyenne (± erreur-type). * $P < 0,05$ and *** $P < 0,001$ vs. Sham NaCl 0,9%, ## $P < 0,01$ et ### $P < 0,001$ vs. Sham CP-3(iv), ^λ $P < 0,05$ and ^{λλ} $P < 0,01$ vs. I/R NaCl 0,9%.

3.7.2. Ex vivo (cœur isolé)

La fonction cardiaque a été mesurée sur des cœurs isolés de souris WT et déficiente en CD36^{-/-} en mode Langendorff après une ischémie induite par un faible débit (correspondant à 10% du débit normal) du cœur. Nous avons observé que la fonction cardiaque des cœurs WT isolés perfusés avec l'azapeptide, a été améliorée.

En fait, le RPP (*rate pressure product*), obtenu par la multiplication de la fréquence cardiaque et de la pression ventriculaire gauche développée, chez les souris ayant reçu le traitement avec le CP-3(iv), est significativement plus élevé au cours des 20 premières minutes de la reperfusion (de 57 à 75%) ($P < 0,05$ - $P < 0,01$) (Figure 10B).

De même, le débit coronaire (figure 11A), la pression artérielle moyenne des cœurs isolés perfusés avec l'azapeptide ont été également augmentés au cours des 20 premières minutes de la reperfusion avec des augmentations de la pression variant de 66% à 152% ($P < 0,05$ - $P < 0,001$) (Figure 11B). Tandis que les indices de contractilité dp/dt max et min ont montré une tendance à être plus et moins élevés, respectivement, chez les cœurs de souris perfusés avec le CP-3(iv) comparativement à ceux perfusés avec le NaCl 0,9%, la pression systolique a augmenté de 53% ($P < 0,05$) dans les premières minutes de la reperfusion (figure 11C, D et E). La pression diastolique des cœurs isolés n'a pas été affectée par le traitement avec l'azapeptide (figure 11F).

En utilisant des cœurs de souris CD36^{-/-}, nous avons pu constater que cet effet local de l'azapeptide chez le cœur isolé est également dépendant du CD36 puisqu'aucune des fonctions cardiaques du cœur n'a été améliorée chez les souris déficientes en CD36 (Figure 12 et 13).

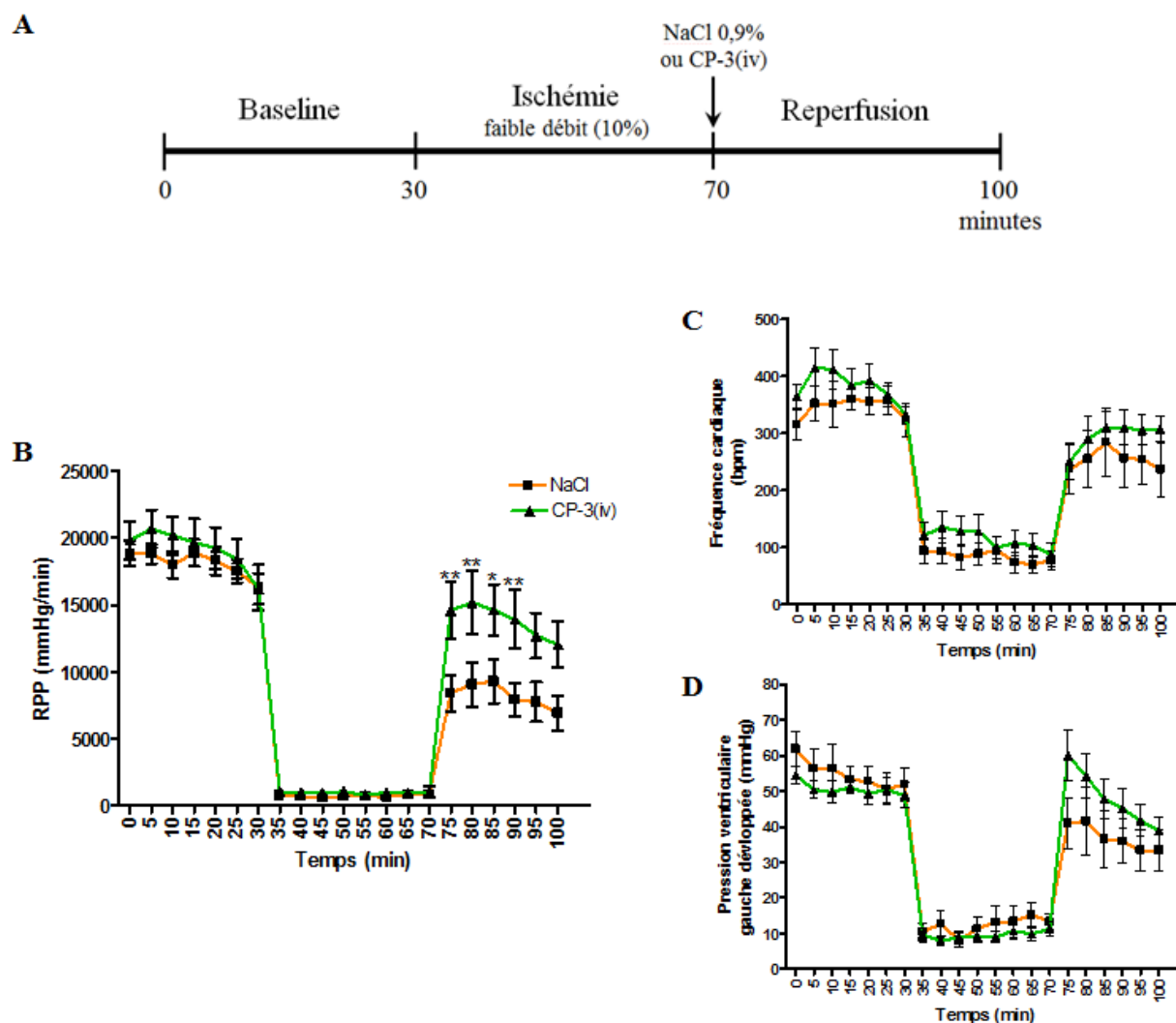


Figure 10. Effet du CP-3(iv) sur le RPP chez le cœur isolé de souris WT après 30 minutes de perfusion à pression constante suivi de 40 minutes de perfusion à 10% du débit initial et 30 minutes de reperfusion.

(A) Représentation schématique du protocole expérimental montrant la durée de l'acquisition des données pour la fonction basale du cœur, de l'ischémie à faible débit et de la reperfusion de cœurs de souris WT isolés perfusés avec le CP-3(iv) à une concentration de 10^{-6} M ou avec le véhicule. (B) Le RPP, (C) la fréquence cardiaque et (D) la pression ventriculaire gauche développée chez les cœurs isolés de souris WT. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 6-8 souris par groupe. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ vs. NaCl 0,9%.

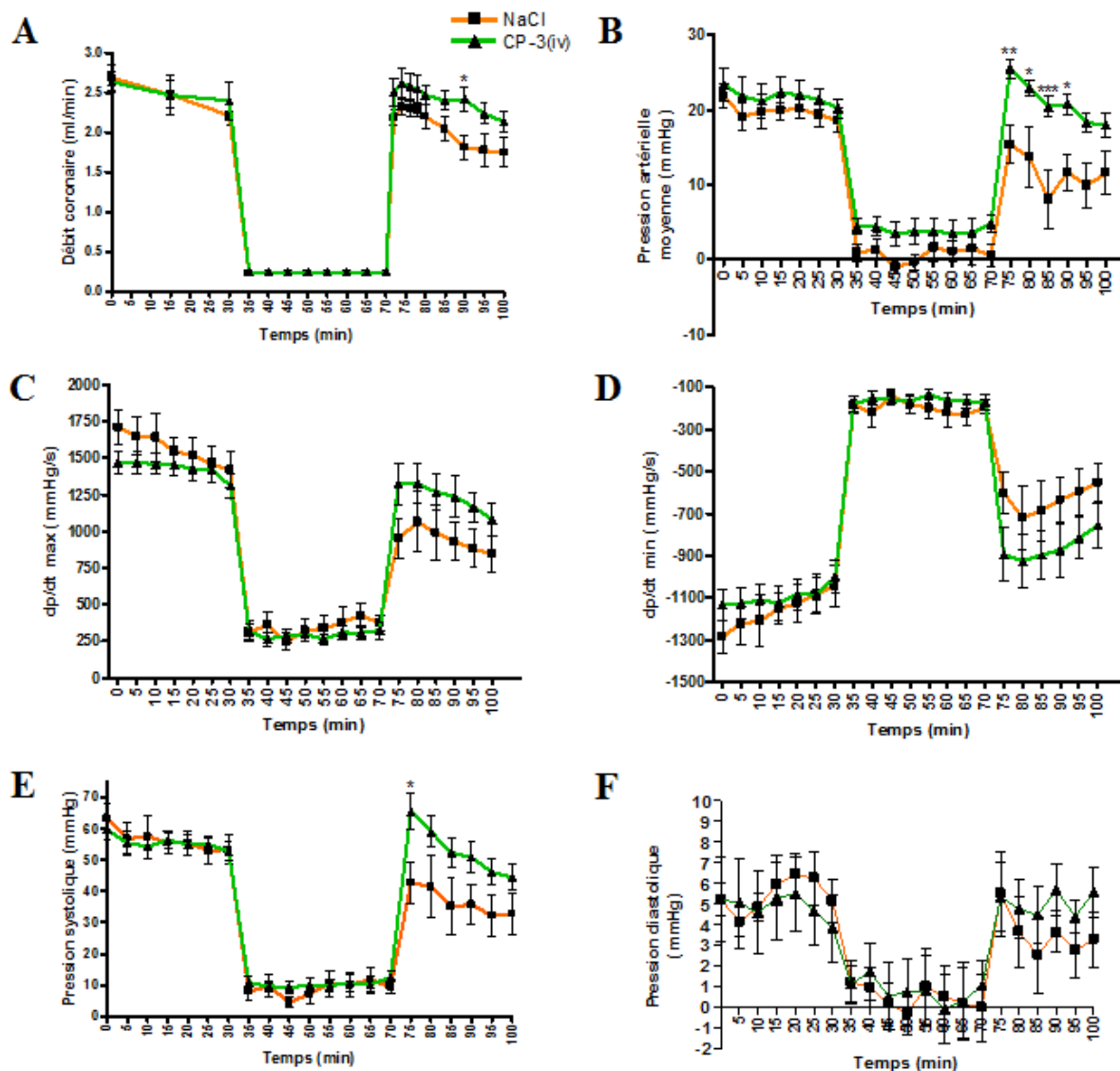


Figure 11. Effet du CP-3(iv) sur la pression artérielle moyenne chez le cœur isolé de souris WT exposé à 30 minutes de perfusion à pression constante à 10% du débit initial, suivie de 40 minutes de perfusion.

(A) Le débit coronaire, (B) la pression artérielle moyenne, (C) le dp/dt maximum, (D) le dp/dt minimum, (E) la pression systolique et (F) la pression diastolique chez les cœurs isolés de souris WT perfusés avec le CP-3(iv) à une concentration de 10^{-6} M ou avec le véhicule. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 6-8 souris par groupe. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. NaCl 0,9%.

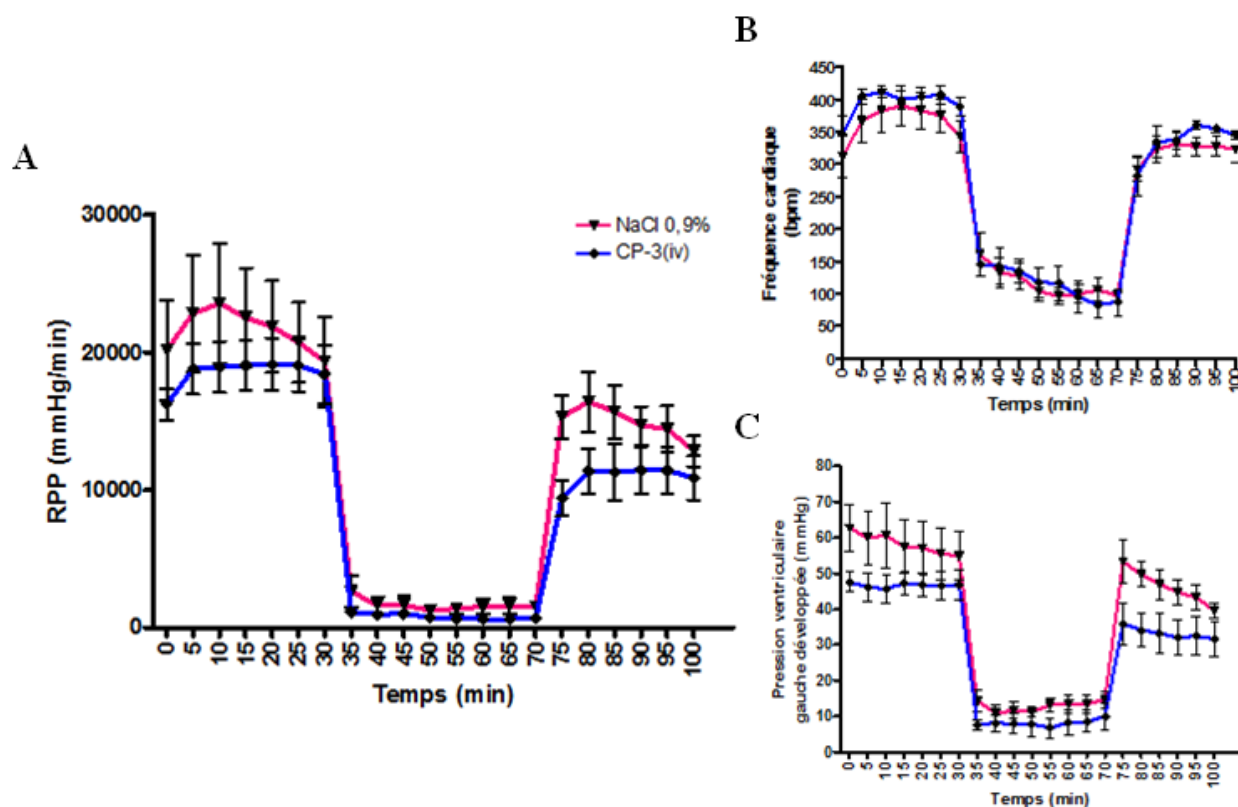


Figure 12. Effet du CP-3(iv) sur le RPP chez le cœur isolé de souris CD36^{-/-} soumis à 30 minutes de perfusion à pression constante à 10% du débit initial, suivie de 40 minutes de reperfusion.

(A) Le RPP, (B) la fréquence cardiaque et (C) la pression ventriculaire gauche développée chez les cœurs isolés de souris CD36^{-/-}. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 7 cœurs de souris par groupe. Les cœurs ont été perfusés avec le CP-3(iv) à une concentration de 10^{-6} M ou avec le véhicule.

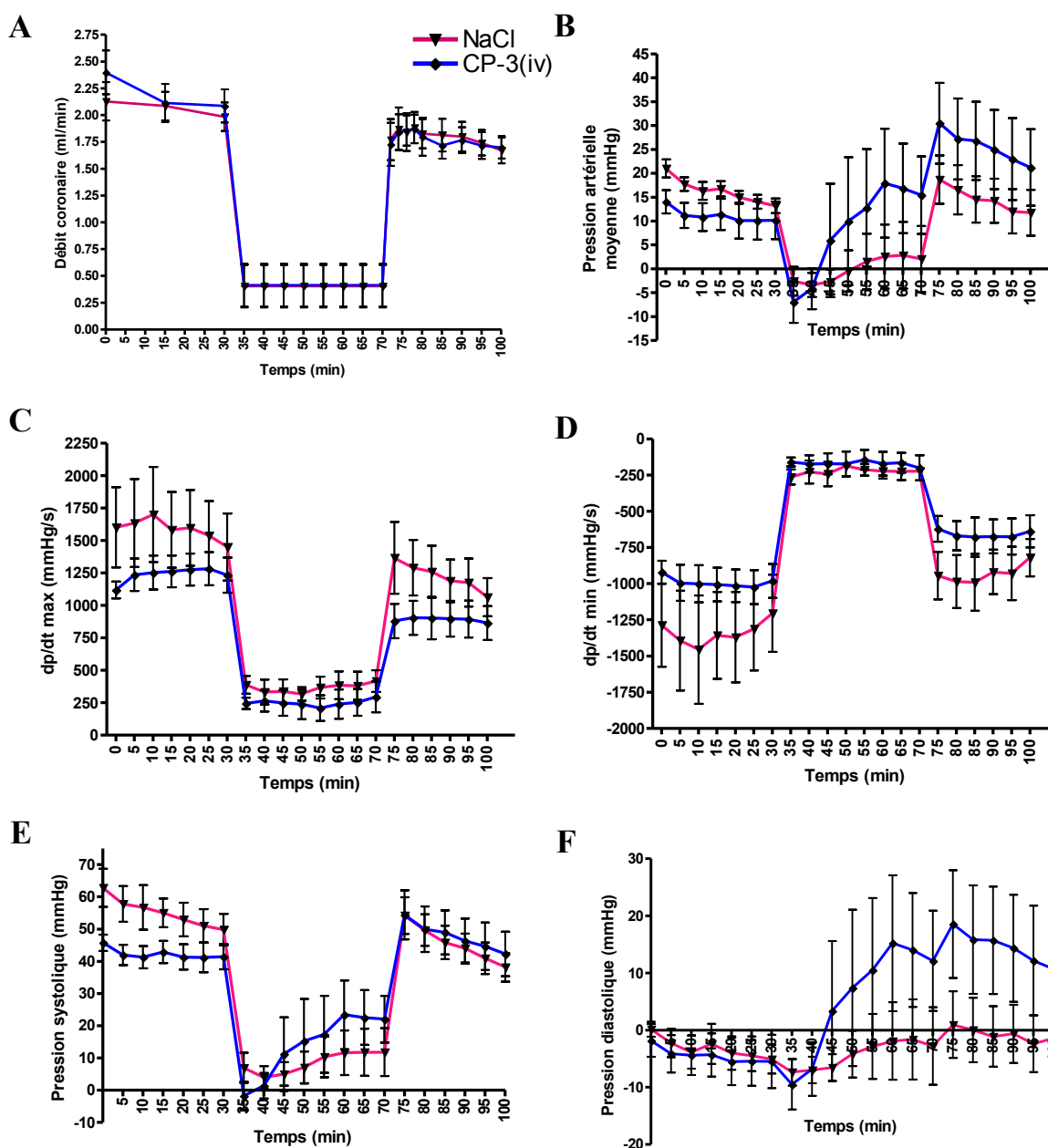


Figure 13. Effet du CP-3(iv) sur les fonctions cardiaques chez le cœur isolé de souris CD36^{-/-} soumis à 30 minutes de perfusion à pression constante à 10% du débit initial suivie de 40 minutes de reperfusion.

(A) Le débit coronaire, (B) la pression artérielle moyenne, (C) le dp/dt maximum, (D) le dp/dt minimum, (E) la pression systolique et (F) la pression diastolique chez les cœurs isolés de souris WT perfusés avec le CP-3(iv) à une concentration de 10^{-6} M ou avec le véhicule. Les valeurs représentent la moyenne (\pm erreur-type) de 7 souris par groupe.

4. DISCUSSION

Ce travail appuie notre hypothèse de recherche selon laquelle un ligand azapeptide du récepteur CD36, le CP-3(iv) a, par son interaction avec son récepteur, un effet cardioprotecteur contre les dommages induits par une MI/R. Considérant que le récepteur CD36 facilite l'internalisation des acides gras dans les cardiomyocytes, un rôle physiologique, nous pouvions appréhender un effet délétère du récepteur dans des circonstances où les taux d'acides gras circulants sont élevés, comme lors d'un infarctus du myocarde. De plus, nos résultats ont montré que les effets bénéfiques du CP-3(iv) au niveau cardiaque étaient liés à un effet anti-oxydant, cytoprotecteur et mitoprotecteur. Et, pour la première fois, nous avons observé que le CP-3(iv) augmente les niveaux d'APN, une hormone cardioprotectrice, qui pourrait médier, du moins en partie, les effets cardioprotecteurs du ligand azapeptide lors d'une situation d'MI/R.

4.1. Le CP-3(iv) diminue la taille de l'infarctus après une MI/R

L'administration de l'azapeptide CP-3(iv) de façon quotidienne pendant une période de 14 jours précédant l'induction expérimentale d'une MI/R a réduit la taille de l'infarctus chez des souris WT montrant qu'un ligand du récepteur CD36 permet une diminution importante (54%) de la taille de l'infarctus (figure 1). L'importance est non seulement la réduction des lésions au niveau du VG, mais aussi l'amélioration de l'hémodynamie cardiaque par le prétraitement (tableau 1), tel qu'il en sera discuté plus loin. Ces observations sont en accord avec nos résultats d'études antérieures, au cours desquelles nous avons documenté que le EP 80317, un ligand du récepteur CD36 de la famille des sécrétines de l'HC, diminuait la taille de l'infarctus de 31% et améliorait la fonction cardiaque après la reperfusion (Bessi *et al.*, 2012).

Au niveau technique, le fait que le pourcentage de l'AAR ne diffère pas entre les groupes indique que la ligature de la LAD a été effectuée avec succès à la même hauteur, soit environ 1 mm sous la pointe de l'oreillette gauche, ce qui est indispensable à l'interprétation des résultats (figure 1D).

Une observation majeure est que les effets observés sont dépendants de l'expression du récepteur CD36, puisque les souris déficientes en ce dernier n'ont pas été protégées des effets néfastes d'une MI/R sur la taille de l'infarctus (figure 2).

4.2. Le CP-3(iv) n'affecte pas les niveaux plasmatiques de TG et d'AGNE

Le CD36 ayant un rôle important dans la facilitation de l'internalisation des acides gras, une conséquence potentielle d'un traitement systémique avec le CP-3(iv) aurait pu être une réduction des taux circulants d'AGNE et, par conséquent, une réduction de leur internalisation au niveau des cardiomyocytes. En effet, ce phénomène nous était apparu comme un mécanisme important sous-jacent à l'effet cardioprotecteur du EP 80317 (Bessi *et al.*, 2012). Bessi *et al.* ont montré, que les souris traitées avec le véhicule présentaient des niveaux plasmatiques d'AGNE plus élevées chez les souris WT que chez les souris CD36^{-/-} après une reperfusion de 6 heures, mais qu'à 48 heures de reperfusion l'inverse se produisait. La diminution du niveau plasmatique d'AGNE entre 6 et 48 heures de reperfusion était donc beaucoup importante chez les WT que chez les CD36^{-/-}, appuyant ainsi l'importance du CD36

dans l'internalisation des AGNE dans les cellules à la reperfusion du cœur ischémié. De plus, le traitement avec le EP 80317 a, quant à lui, été associé à une diminution des niveaux plasmatiques d'AGNE comparativement au véhicule en conséquence d'une réduction de la lipolyse, et ainsi à une diminution de l'internalisation globale de ceux-ci au niveau cardiaque tel qu'observé dans des études de tomographie par émission de positrons (μ TEP) avec un traceur d'acides gras, le [^{18}F]-FTHA (Bessi *et al.*, 2012). Cependant, un prétraitement par le CP-3(iv) n'a pas modulé les taux plasmatiques d'AGNE, ni les TG, du moins au temps documentés post-reperfusion chez les souris WT (soit 6 et 48 heures) (figure 4). Néanmoins, nos résultats suggèrent un effet métabolique bénéfique du peptide en favorisant l'absorption du glucose et en réduisant l'oxydation des acides gras (résultats non montrés). La structure différente des deux azapeptides pourrait expliquer, du moins en partie, que ceux-ci exercent leurs effets de manière différente. En effet, le EP 80317 (Haic-D-2-méthyl-Trp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) ne possède pas de groupement Aza contrairement au CP-3(iv) (Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH₂). Le groupement aza confère un repliement bêta à la conformation de ces peptides (Proulx *et al.*, 2011), changeant ainsi potentiellement leur interaction avec le récepteur et améliorant leur sélectivité envers le CD36 (Sabatino *et al.*, 2009). Des études supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer les voies de signalisation engendrées par la liaison de ces deux peptides au CD36 afin de mieux cerner les différences dans leur mode d'activation du récepteur.

Ces observations, couplées à celles d'études préliminaires montrant un effet potentiellement anti-oxydant du CP-3(iv), ainsi qu'une modulation transitoire des taux d'APN, ont dirigé nos études mécanistiques vers d'autres avenues sans toutefois complètement exclure un effet bénéfique sur le métabolisme énergétique. En effet, le taux de lactate sanguin a

diminué chez les souris traitées avec le CP-3(iv) dans les premières minutes suivant la reperfusion des cœurs ischémiques, suggérant une réduction de l'accumulation et/ou de la formation de lactate myocardique chez ces souris (figure 3).

4.3. Le CP-3(iv) augmente le niveau plasmatique d'APN de haut poids moléculaire

L'APN étant reconnu pour avoir un effet cardioprotecteur à la suite d'une MI/R (Wang *et al.*, 2010) et l'identification de voies de signalisation communes au CD36 et celles conduisant à une augmentation de l'expression de l'APN au niveau adipocytaire (Iwaki *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004; Qiang *et al.*, 2007;) nous avons voulu vérifier si notre traitement avait modifié les niveaux circulants d'APN. Les niveaux plasmatiques d'APN de haut poids moléculaire et d'APN totaux ont donc été mesurés chez les souris ayant subi une ischémie de 30 minutes suivie d'une reperfusion de 6 et de 48 heures.

Nos résultats ont montré une augmentation de 35% ($P < 0,05$) de l'APN HMW, la forme reconnue pour ses effets cardioprotecteurs (Nanayakkara *et al.*, 2012), à la suite d'une reperfusion de 6 heures suivant la ligature de la LAD chez les souris traitées avec le CP-3(iv) (figure 5A). Toutefois, cet effet est transitoire puisqu'à 48 heures de reperfusion, les taux plasmatiques d'APN HMW des souris traitées avec le CP-3(iv) sont revenus au même niveau que les souris traitées avec le véhicule.

Des études menées dans le laboratoire ont également permis de démontrer que les niveaux d'ARNm d'APN, l'Adipoq, sont modulés de façon significative dans le tissu adipeux lors de la reperfusion à 6 heures, mais pas à 48 heures. Le niveau d'Adipoq dans l'homogénat cardiaque est, lui non plus, non modulé de façon significative (résultats non montrés). L'APN plasmatique proviendrait donc principalement du tissu adipeux bien qu'on ne puisse exclure une contribution cardiaque.

Le traitement avec le CP-3(iv), par son action sur le récepteur CD36, permettrait une augmentation transitoire du niveau plasmatique d'APN HMW chez les souris ayant subi une MI/R, puisqu'un prétraitement avec le CP-3(iv) chez des souris déficientes en récepteur CD36 ayant subi la même opération n'entraîne aucune modulation des niveaux plasmatiques d'APN HMW (figure 5A).

Un autre élément intéressant est que les niveaux plasmatiques d'APN chez les souris CD36^{-/-} sont, peu importe la durée de la reperfusion, inférieurs aux niveaux plasmatiques obtenus chez les souris WT correspondantes aux mêmes traitements et chirurgie. Cela suggère donc que l'absence du récepteur CD36 fonctionnel chez les souris CD36^{-/-} affecte la production d'APN. À l'appui, il a été rapporté que les niveaux d'APN dans le sang, ainsi que son expression dans le tissu adipeux est plus bas chez les souris CD36^{-/-} que chez les souris WT, et ce, en situation physiologique normale (Hajri *et al.*, 2007). Le niveau d'APN chez les souris déficientes en CD36 n'est pas élevé par comparaison aux souris WT, mais ces souris démontrent tout de même une protection lors d'une MI/R, visible par leur niveau d'IA/AAR inférieur à celui des souris WT lorsqu'elles sont traitées avec le véhicule (27,6% vs 40% chez les WT, figure 1 et 2). L'absence de CD36 chez ces souris peut expliquer cette protection

puisque le fait de ne pas avoir de CD36 permet de restreindre l'internalisation des acides gras lors de la reperfusion et en conséquence, leur oxydation. L'internalisation accrue des acides gras à longue chaîne lors de la reperfusion, tel que décrit plus tôt, est dommageable pour le cœur. Une diminution de leur internalisation due à l'absence de CD36, permet de réduire la lipotoxicité grâce à l'utilisation préférentielle de glucose comme source d'énergie (Yang *et al.*, 2007). Les souris CD36^{-/-} sont donc protégées en situation de MI/R dû à l'absence de CD36 et ce, malgré un niveau d'APN faible.

Puisque les souris CD36^{-/-} possèdent une concentration plasmatique d'APN, en situation physiologique normale, inférieure au WT, il aurait été intéressant de mesurer les quantités d'APN chez des souris WT et CD36^{-/-} afin de constater si, en situation d'une MI/R, les niveaux sont modulés dans le même ordre de grandeur chez les deux lignées de souris. De plus, la mesure des niveaux d'APN, avant la chirurgie, chez les souris prétraitées aurait permis de constater si le prétraitement permet une augmentation de la production d'APN avant une situation de stress comme la MI/R ce qui serait cardioprotecteur pour les souris.

4.4. Le CP-3(iv) diminue la production de ROS dans les cardiomyocytes

Considérant les effets potentiellement anti-inflammatoires et anty-oxydants observés dans nos études préliminaires avec les ligands du CD36 chez des souris soumises à un infarctus du myocarde (Bessi *et al.*, non publié), nous avons vérifié si la protection engendrée

par le prétraitement avec l'azapeptide, observée lors de la MI/R, ne viendrait pas de la diminution de la production de ROS, puisqu'il s'agit d'un élément important pouvant mener à des dommages myocardiques lors d'une MI/R. Le stress oxydatif engendré par la production des ROS peut être la cause d'une inflammation (Pasquier, 1995). La diminution de la production de ROS, à l'aide d'un traitement avec un ligand du CD36, pourrait permettre une protection contre la réponse inflammatoire engendrée par l'accumulation des leucocytes dans la zone péri-infarctus à la suite d'une MI/R. En effet, Pasquier a démontré que lorsque les cellules endothéliales sont soumises à de hauts niveaux de ROS, comme lors d'une MI/R, les polynucléaires neutrophiles adhèrent plus fortement à celles-ci et cela engendre une pénétration accrue des leucocytes dans les tissus (Pasquier, 1995). La libération d'anions superoxyde par la xanthine oxydase activent la sécrétion des chimioattractants ou/et l'expression de molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales, entraînant un influx de neutrophiles dans les tissus et provoquant l'inflammation (Pasquier, 1995).

Nous avons donc mesuré la production de ROS dans le sang et l'homogénat cardiaque. Nous avons pu constater une tendance à la diminution, non-significative, de la production de ROS au niveau plasmatique mais que les niveaux de ROS produit dans l'homogénat cardiaque, ont été diminués de 51% chez les souris prétraitées avec le CP-3(iv) comparativement au véhicule (figure 6A). De plus, on observe une très bonne corrélation entre les niveaux de ROS cardiaque et sanguin (figure 6C). Sachant que le prétraitement diminue la production de ROS myocardique, nous avons voulu déterminer la provenance de ces ROS, soit mitochondriale, soit via la NADPH oxydase des leucocytes accumulés. Afin de déterminer si la production de ROS à la suite de l'ischémie-reperfusion provient des mitochondries, de grands producteurs de ROS, les fibres des cœurs des souris ayant reçu d'un prétraitement des

souris par le CP-3(iv) suivie d'une ischémie de 30 minutes et d'une reperfusion de 6 heures, ont été isolées et utilisées afin de déterminer, *in situ*, l'effet potentiellement anti-oxydant de l'azapeptide. En ajoutant différents substrat aux fibres isolées de cœur de souris, nous avons pu constater une diminution de la production de ROS de près de 20% chez les souris prétraitées avec le CP-3(iv) lors de l'ajout de succinate (figure 7). Le traitement permet donc de diminuer la production de ROS au niveau mitochondrial dans les cœurs de souris subissant une MI/R de 6 heures de reperfusion. Toutefois, ceci explique en partie seulement la réduction de ROS observée dans l'homogénat cardiaque. Les mitochondries ne constituent donc pas la seule source de ROS lors de la MI/R. Des études ultérieures pourraient investiguer d'autres sources possible de ROS, dont l'accumulation leucocytaire dans la zone péri-infarctus (Jin *et al.*, 2010) afin de déterminer par quels autres mécanismes le prétraitement permet la diminution de ROS lors de la MI/R.

Sachant que le prétraitement affectait un mécanisme mitochondrial, nous avons vérifié, par la même occasion, son effet sur l'ouverture du mPTP, un autre évènement délétère en situation d'ischémie-reperfusion. Il s'est avéré que le prétraitement, selon les résultats obtenus, n'affecte pas le délai d'ouverture du pore, ni le niveau d'absorption du calcium par celui-ci (figure 8). Toutefois, l'utilisation des fibres cardiaques pour les mesures de ROS mitochondriales et de mPTP, dans notre contexte d'MI/R est liée à certaines limites expérimentales.

En effet, l'ischémie induite par la ligature de la LAD n'étant que produite dans une portion du ventricule gauche, les mesures obtenues grâce aux différents échantillons d'un même cœur peuvent différer selon la portion du ventricule qui est utilisée. Pour chaque cœur,

le ventricule gauche a été isolé en fibres et ensuite divisées en six échantillons afin d'effectuer les tests de ROS et de mPTP en triplicata. Cela peut avoir mené à l'obtention d'échantillons ayant plus ou moins de zone ischémiée ce qui engendre une variation dans les résultats. Cela pourrait expliquer les quelques situations dans lesquels les tests n'ont pas permis ou permis tardivement l'ouverture du mPTP. Il serait donc préférable d'isoler seulement la zone ischémiée, mais, à ce moment-là, la quantité d'échantillon disponible pour les tests se retrouverait considérablement diminuée et il faudrait donc augmenter le nombre d'animaux utilisés. Il aurait été souhaitable de faire des études avec des fibres cardiaques provenant de cœurs isolés puisque les mesures de ROS et de l'ouverture du mPTP ont été faites sur des fibres cardiaques du ventricule gauche dans son ensemble et non seulement sur la portion ischémiée du ventricule. Les cœurs isolés, ayant eu une ischémie globale et plus uniforme, pourraient permettre d'obtenir des résultats plus représentatifs des effets de l'ischémie.

Étant donné que le prétraitement par l'azapeptide a diminué la production de ROS au niveau mitochondrial, nous avons regardé l'activité de certaines enzymes mitochondriales pouvant être modifiées par la présence de ROS ou pouvant causer des dommages lors d'un stress comme l'ischémie-reperfusion du myocarde. La diminution de la quantité de ROS produite via le prétraitement avec le CP-3(iv), permet aux enzymes d'être modulées. Nos résultats ont montré qu'un prétraitement avec le CP-3(iv) permettait d'augmenter l'activité de l'aconitase, une enzyme du cycle de l'acide citrique sensible à la présence de ROS. En effet, une augmentation de ROS dans le milieu mène à une diminution de l'activité de l'enzyme.

Donc l'augmentation de l'activité de l'aconitase, de l'ordre de 33%, suggère une diminution des ROS (figure 9A).

Les dommages mitochondriaux peuvent mener à l'activation des caspases, des enzymes impliquées dans le processus d'apoptose. Nos résultats ont montré qu'un prétraitement avec le CP-3(iv) suivi d'une MI/R avec 6 heures de reperfusion permet de diminuer l'activité de la caspase 3 de près de 15%, suggérant une réduction de l'apoptose des cellules (figure 9B).

4.5. Le CP-3(iv) améliore la fonction cardiaque *in vivo*

En résumé, nous avons constaté que le traitement avec l'azapeptide diminue la taille de l'infarctus, diminue la production de ROS et améliore l'activité de certaines enzymes. De plus, il n'affecte pas le métabolisme énergétique puisque les niveaux de TG, d'AGNE, ainsi que de glucose ne sont pas modifiés. Donc, nous avons voulu déterminer si le prétraitement avec l'azapeptide permettait, grâce à ses effets, une amélioration des fonctions cardiaques chez les souris à la suite d'une ischémie-reperfusion.

L'utilisation d'un cathéter de conductance, inséré dans le cœur des souris, a permis l'enregistrement de courbes pression-volume, ce qui nous a permis de constater une détérioration de la fonction cardiaque chez les souris ayant été prétraitées avec le véhicule et ayant subi une MI/R de 48 heures de reperfusion comparativement aux souris sham, n'ayant pas subi la chirurgie. En effet, le VES ainsi que le DC ont été diminués après l'induction d'un

infarctus chez la souris. Toutefois, la fréquence cardiaque des souris n'a pas été affectée. Le cœur a donc perdu de sa force de contraction comme on peut le constater par une diminution du volume d'éjection systolique et du débit cardiaque (tableau 1). Par contre, lors d'un prétraitement avec l'azapeptide, les paramètres hémodynamiques post-reperfusion, incluant la résistance périphérique totale, retournent à des niveaux normaux semblables aux shams, dont la fonction cardiaque ne varie pas avec le prétraitement.

4.6. Le CP-3(iv) améliore la fonction cardiaques *ex vivo*

Afin de déterminer si l'amélioration de la fonction cardiaque était due à un effet systémique ou plutôt à un effet local, les paramètres hémodynamiques ont aussi été déterminés sur des cœurs isolés de souris soumis à une ischémie à faible débit, correspondant à 10% du débit normal du cœur. Nous avons pu constater, qu'en effet, les cœurs des souris WT traités avec l'azapeptide à la suite des 30 minutes d'ischémie à faible débit ont montré une fonction cardiaque améliorée (figure 10 et 11).

En effet, le RPP, principale mesure permettant de déterminer la qualité de la fonction cardiaque d'un cœur isolé, représentant le produit de la fréquence cardiaque et de la pression ventriculaire gauche développée, est modulé par le traitement. Dans les expériences *ex vivo*, les cœurs de souris WT et CD36^{-/-} ont été traités avec le véhicule ou l'azapeptide à la reperfusion seulement. Nous avons pu constater que le traitement avec le CP-3(iv) permettait une augmentation significative du RPP dès son administration au début de la reperfusion chez

les souris WT et non chez les souris CD36^{-/-} (figure 10B). De plus, la pression artérielle moyenne des cœurs de souris WT a également été augmentée de façon importante dans les 20 premières minutes de reperfusion (figure 11B). Le cœur des souris WT répond donc au ligand du CD36 et non celui des souris CD36^{-/-} après une ischémie globale de 40 minutes à 10% du débit initial et une reperfusion de 30 minutes (figure 12 et 13).

4.7. Le CP-3(iv), un avenue thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires

Les ligands du récepteur CD36, dont le CP-3(iv), montre un potentiel thérapeutique important puisqu'ils permettent de réduire les dommages lors d'une MI/R. Puisque le CP-3(iv) permet de diminuer la taille de l'infarctus chez les souris ayant été prétraitées avec celui-ci, l'utilisation du CP-3(iv) comme traitement de prévention chez les personnes atteintes de maladies cardiovasculaires est à envisager. En particulier, un traitement par le CP-3(iv) pourrait prévenir des dommages associés à la reperfusion lors d'une intervention cardiaque, comme un pontage coronarien, une angioplastie ou si une revascularisation (thrombolyse) s'avère nécessaire.

De plus, le CP-3(iv) n'a pas seulement montré des effets lors de son utilisation comme prétraitement, mais également lors de son utilisation quelques minutes avant la reperfusion in vivo. En effet, une administration de CP-3(iv) 10 min avant la reperfusion du cœur ischémié chez les souris, à une concentration de 1000 nmol/kg a également montré une diminution de la taille de l'infarctus du 44% IA/VG (résultat non montré). De plus, nos résultats ont montré que le CP-3(iv) a montré des effets bénéfiques lors de son administration à la reperfusion chez le

cœur isolé en améliorant les fonctions cardiaques à la suite d'une ischémie induite par une réduction du débit (figure 10). Une administration de l'azapeptide, avant la revascularisation, pourrait donc être avoir un effet cardioprotecteur.

4.8. Conclusion

Pour conclure, un prétraitement avec le CP-3(iv), un ligand du récepteur CD36, chez des souris subissant une ischémie-reperfusion du myocarde permet de diminuer la taille de l'infarctus et préserve l'hémodynamie cardiaque de façon dépendante du CD36 puisque cet effet est non visible chez les souris CD36^{-/-}. De plus, nos résultats ont montré que l'azapeptide exerce non seulement un effet systémique, mais aussi un effet cardioprotecteur direct sur le cœur isolé. Ce constat répond à notre premier objectif de recherche. De plus, nos résultats ont permis d'élucider, du moins en partie, le mécanisme d'action de l'azapeptide. Nous croyons, d'une part, que les effets anti-oxydants et anti-inflammatoires de l'azapeptide contribue de façon importante à ses effets cardioprotecteurs et préserve l'intégrité tissulaire en réduisant l'apoptose accompagnant une MI/R. D'autre part, nos résultats appuient l'existence d'un lien entre la sécrétion accrue d'APN par le tissu adipeux chez les souris traitées et l'expression du CD36. Puisque l'APN a des effets anti-inflammatoires, l'utilisation du CP-3(iv) engendre des effets anti-inflammatoires en conséquence d'une augmentation de la production d'APN, du moins en partie. En effet, l'APN inhibe l'activation de NF- κ B dans les cellules endothéliales en activant l'AMPK. L'inhibition de NF- κ B par l'APN entraîne une diminution de l'expression du CRP, d'IL-8 (interleukine-8) et de molécules d'adhérence. Dans les macrophages, l'APN atténue également la production de TNF- α (Ouchi et Wash, 2008).

L'augmentation de la sécrétion d'APN HMW apparaît aussi comme un mécanisme contribuant aux effets cardioprotecteurs de l'azapeptide, bien que cet effet reste à être documenté dans des études ultérieures.

4.9. Perspectives

Bien que le CP-3(iv) est augmenté la production d'APN et que nos résultats appuient des études publiées antérieurement montrant un lien entre le CD36 et l'APN, il faudrait s'assurer que le peptide n'agit pas sur son catabolisme en réduisant sa clairance, et documenter si la production d'APN par les cardiomyocytes pourrait jouer un rôle.

Une façon de vérifier le rôle potentiel de l'APN cardiaque pourrait être de neutraliser l'effet de l'APN endogène, par exemple à l'aide d'anticorps neutralisants, chez le cœur isolé subissant une ischémie et une reperfusion, tel que décrit dans ce travail. Cela pourrait nous permettre de déterminer si l'effet du peptide sur la fonction cardiaque observé sur ces cœurs isolés proviendrait de l'APN produite et présente au niveau cardiaque.

Des études cliniques serait par la suite à faire afin de déterminer si un traitement avec le CP-3(iv) administré de façon préventif et/ou curatif chez les patients atteints de maladies cardiaques ischémiques, permet une amélioration de la guérison des patients en diminuant les dommages. Un traitement chez les patients montrant des facteurs de risques de ces maladies avant qu'elle ne survienne ou chez les patients avant des interventions chirurgicales à la suite de la maladie pourrait peut-être être envisageable.

Références

Acton S.L., Scherer P.E., Lodish H.F., and Krieger M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* **269**: 21003-21009.

Adlam V.J., Harrison J.C., Porteous C.M., James A.M., Smith R.A., Murphy M.P., and Sammut I.A. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* **19**: 1088-1095.

American Heart Association. (2012). Understand Your Risk of Heart Attack.

http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HeartAttack/UnderstandYourRiskofHeartAttack/Understand-Your-Risk-of-Heart-Attack_UCM_002040_Article.jsp , visité le 06-04-2014.

Amin R.H., Mathews S.T., Alli A., and Leff T. (2010). Endogenously produces adiponectin protects cardiomyocytes from hypertrophy by a PPAR γ -dependent autocrine mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **299**: H690-H698.

Amin R.H., Mathews S.T., Camp H.S., Ding L., and Leff T. (2010). Selective activation of PPAR γ in skeletal muscle induces endogenous production of adiponectin and protects mice from diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **298**: E28-E37.

Aon M.A., Bhatt N., and Cortassa S.C. (2014). Mitochondrial and cellular mechanisms of managing lipid excess. *Front Physiol.* **5**; 282.

Armesilla A.L. and Vega M.A. (1994). Structural organization of the gene of human CD36 glycoprotein. *J Biol Chem.* **269**: 18985-18991.

Agence de la santé publique du Canada. (2009). 2009 Suivi des maladies du cœur et des accidents vasculaires cérébraux au Canada. <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/2009/cvd-avc/pdf/cvd-avs-2009-fra.pdf>

Ashraf M.Z., Kar N.S., Chen X., Choi J., Salomon R.G., Febbraio M., and Podrez E.A. (2008). Specific oxidized phospholipids inhibit scavenger receptor bi-mediated selective uptake of cholesteryl esters. *J Biol Chem.* **283**: 10408-10414.

Baillie A.G., Coburn C.T., and Abumrad N.A. (1996). Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog. *J Membr Biol.* **153**: 75-81.

Basso C., Corrado D., and Thiene G. (1999). Cardiovascular causes of sudden death in young individuals including athletes. *Cardiol Rev.* **7**: 127-135.

Bessi V.L., Labbé S.M., Huynh D.N., Ménard L., Jossart C., Febbraio M., Guérin B., Bentourkia M., Lecomte R., Carpentier A.C., Ong H., and Marleau S. (2012). EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice. *Cardiovasc Res.* **96**: 99-108.

Bettencourt P. (2002). Brain natriuretic peptide (nesiritide) in the treatment of heart failure. *Cardiovasc Drug Rev.* **20**: 27-36.

Bodart V., Febbraio M., Demers A., McNicoll N., Pohankova P., Perreault A., Sejlitz T., Escher E., Silverstein R.L., Lamontagne D., and Ong H. (2002). CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res.* **90**: 844-849.

Bohl S., Medway D.J., Schulz-Menger J., Schneider J.E., Neubauer S., and Lygate C.A. (2009). Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **297**: H2054-H2058.

Bolduc O.R., Lambert-Lanteigne P., Colin D.Y., Zhao S.S., Proulx C., Boeglin D., Lubell W.D., Pelletier J.N., Féthière J., Ong H., and Masson J.-F. (2011). Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst.* **136**: 3142-3148.

Boudi F.B. and Ahsan C.H. (2013). Risk factors for coronary artery disease. *Medscape*. <http://emedicine.medscape.com/article/164163-overview>, visité le 06-04-2014.

Bujold K., Mellal K., Zoccal K.F., Rhainds D., Brissette L., Febbraio M., Marleau S., and Ong H. (2013). EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis.* **229**: 408-414.

Brenner C., Ventura-Clapier R., and Jacotot E. (2012). Mitochondria and cytoprotection. *Biochem Res Int.* **2012**: 1-2.

Bricker D.K., Taylor E.B., Schell J.C., Orsak T., Boutron A., Chen Y.C., Cox J.E., Cardon C.M., Van Vranken J.G., Dephoure N., Redin C., Boudina S., Gygi S.P., Brivet M., Thummel C.S., and Rutter J. (2012). A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, drosophila, and humans. *Science.* **337**: 96-100.

Campbell N.A. and Reece J.B. (2007). Biologie. Éditions du renouveau pédagogique inc., 3^e édition. **Chapitre 9**: 173-188.

Chua C.C., Gao J., Ho Y.S., Xu X., Kuo I.C., Chua K.Y., Wang H., Hamdy R.C., Reed J.C., and Chua B.H. (2009). Over-expression of a modified bifunctional apoptosis regulator protects against cardiac injury and doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* **81**: 20–27.

Clanachan A.S. (2006). Contribution of protons to post-ischemic Na⁺ and Ca²⁺ overload and left ventricular mechanical dysfunction. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **17**: S141-S148.

Collot-Teixeira S., Martin J., McDermott-Roe C., Poston R., and McGregor J.L. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* **75**: 468-477.

Corrado D., Basso C., Pavei A., Michieli P., Schiaivon M., and Thiene G. (2006). Trends in sudden cardiovascular death in young competitive athletes after implementation of a preparticipation screening program. *JAMA.* **296**: 1593-1601.

De Gennaro Colonna V., Rossoni G., Bernareggi M., Müller E.E., and Berti F. (1997). Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol.* **334**: 201–207.

Demers A., McNicoll N., Febbraio M., Servant M., Marleau S., Silverstein R., and Ong H. (2004). Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J.* **382**: 417-424.

Denzel M.S., Scimia M-C., Zumstein P.M., Walsh K., Ruiz-Lozano P., and Ranscht B. (2010). T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest.* **120**: 4342-4352.

Di Diego J.M. and Antzelevitch C. (2011). Ischemic Ventricular Arrhythmias Experimental Models and Their Clinical Relevance. *Heart Rhythm.* **8**: 1963–1968.

Di Lisa F. and Bernardi P. (2006). Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. *Cardiovasc Res.* **70**: 191-199.

Ding G, Qin Q., He N., Francis-David S.C., Hou J., Liu J., Ricks E., and Yang Q. (2007). Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Mol Cell Cardiol.* **43**: 73–84.

Drahota Z., Vrbacký M., Nůsková H., Kazdová L., Zidek V., Landa V., Pravenec M., and Houstek J. (2010). Succinimidyl oleate, established inhibitor of CD36/FAT translocase inhibits complex III of mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun.* **391**: 1348-51.

Dridi S. and Taouis M. (2009). Adiponectin and energy homeostasis: consensus and controversy. *J Nutr Biochem.* **20**: 831-839.

Eltzschig H.K. and Collard C. D. (2004). Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* **70**: 71-86.

Espoti D.D., Hamelin J., Bosselut N., Saffroy R., Sebah M., Pommier A., Martel C., and Lemoine A. (2012). Mitochondrial roles and cytoprotection in chronic liver injury. *Biochem Res Int.* **2012**: 1-16.

Fang X., Palanivel R., Cresser J., Schram K., Ganguly R., Thong F.S., Tuinei J., Xu A., Abel E.D., and Sweeney G. (2010). An APPL1-AMPK signaling axis mediates beneficial metabolic effects of adiponectine in the heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **299**: E721-E729.

Febbraio M., Abumrad N.A., Hajjar D.P., Sharma K., Cheng W.L., Pearce S.F.A., and Silverstein R.L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem.* **274**: 19055–19062.

Febbraio M., Guy E., Coburn C., Knapp F.F.Jr., Beets A.L., Abumrad N.A., and Silverstein R.L. (2002). The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36. *Mol Cell Biochem.* **239**: 193–197.

Fondation des maladies du coeur et de l'AVC. (2012). Heart disease prevention.

http://www.heartandstroke.com/site/c.ikIQLcMWJtE/b.3483919/k.EB14/Heart_disease__Prevention_and_risk_factors.htm, dernière révision en juin 2012, visité le 06-04-2014.

Fondation des maladies du cœur et de l'AVC. (2011). Cardiomyopathie. http://www.fmcoeur.com/site/c.ntJXJ8MMIqE/b.3562225/k.3D62/Maladies_du_coeur__Cardiomyopathie.htm, dernière révision en mars 2011, visité le 07-05-2014.

Febbraio M. and Silverstein R.L. (2007). CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**: 2012-2030.

Ganong W.F., Barrett K., Barman S., Boitano S., and Brook H. (2012). Physiologie médicale. 3^e édition. Groupe de Boeck.

Glatz J.F., Luiken J.J.F.P., and Bonen A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev.* **90**: 367-417.

Glatz J.F., Angin Y., Steinbusch L.K., Schwenk R.W., and Luiken J.J. (2013). CD36 as a target to prevent cardiac lipotoxicity and insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **88**: 71-77.

Go A.S., Mozaffarian D., Roger V.L., Benjamin E.J., Berry J.D., Borden W.B., Bravata D.M., Dai S., Ford E.S., Fox C.S., Franco S., Fullerton H.J., Gillespie C., Hailpern S.M., Heit J.A., Howard V.J., Huffman M.D., Kissela B.M., Kittner S.J., Lackland D.T., Lichtman J.H., Lisabeth L.D., Magid D., Marcus G.M., Marelli A., Matchar D.B., McGuire D.K., Mohler E.R., Moy C.S., Mussolino M.E., Nichol G., Paynter N.P., Schreiner P.J., Sorlie P.D., Stein J., Turan T.N., Virani S.S., Wong N.D., Woo D., and Turner M.B. (2013). Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* **127**: e6-e245.

Goff D.C.Jr., Lloyd-Jones D.M., Bennett G., Coady S., D'Agostino R.B.Sr., Gibbons R., Greenland P., Lackland D.T., Levy D., O'Donnell C.J., Robinson J., Schwartz J.S., Shero S.T., Smith S.C.Jr., Sorlie P., Stone N.J., and Wilson P.W. (2013). 2013 ACC/AHA Guideline on the Assessment of Cardiovascular Risk: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 1-50.

Goldstein B.J., Scalia R.G., and Ma X.L. (2009). Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* **6**: 27-35.

Greenwalt D.E., Lipsky R.H., Ockenhouse C.F., Ikeda H., Tandon N.N., and Jamieson G.A. (1992). Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood.* **80**: 1105-1115.

Hajri T., Hall A.M., Jensen D.R., Pietka T.A., Droevr V.A., Tao H., Eckel R., and Abumrad N.A. (2007). CD36-facilitated fatty acid uptake inhibits leptin production and signaling in adipose tissue. *Diabetes*. **56**: 1872-1880.

Habets D.D., Coumans W.A., Voshol P.J., den Boer M.A., Febbraio M., Bonen A., Glatz J.F.C., and Luiken J.J.F.P. (2007). AMPK-mediated increase in myocardial long-chain fatty acid uptake critically depends on sarcolemmal CD36. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**: 204–210.

Hajri T., Ibrahimi A., Coburn C.T., Knapp F.F. Jr., Kurtz T., Pravenec M., and Abumrad N.A. (2001). Defective fatty acid uptake in the spontaneously hypertensive rat is a primary determinant of altered glucose metabolism, hyperinsulinemia and myocardial hypertrophy. *J Biol Chem*. **276**: 23661-23666.

Harb D., Bujold K., Febbraio M., Sirois M.G., Ong H., and Marleau S. (2009). The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. **83**: 42-51.

Hershberger R.E., Morales A., and Siegfried J.D. (2010). Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals. *Genet Med*. **12**: 655-667.

Holloway G.P., Jain S.S., Bezaire V., Han X.X., Glatz J.F., Luiken J.J., Harper M.E., and Bonen A. (2009). FAT/CD36-null mice reveal that mitochondrial FAT/CD36 is required to upregulate mitochondrial fatty acid oxidation in contracting muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **297**: R960-R967.

Horton R., Moran L., Schrimqeur G., Perry M., and Rawn D. (2006). Principles of biochemistry, 4^e edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Huang W., Febbraio M., and Silverstein R.L. (2011). CD9 tetraspanin interacts with CD36 on the surface of macrophages: a possible regulatory influence on uptake of oxidized low density lipoprotein. *PLoS One*. **6**: e29092.

Hug C., Wang J., Ahmad N.S., Bogan J.S., Tsao T.S., and Lodish H.F. (2004). Tcadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**: 10308–10313.

Hullin R., Mohacsi P.J., and Hess O.M. (2003). Formes familiales de cardiomyopathie non ischémique. *Forum Med Suisse*. **13**: 310-318.

Iwaki M., Matsuda M., Maeda N., Funahashi T., Matsuzawa Y., Makishima M., and Shimomura I. (2003). Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*. **52**: 1655-1663.

Ikeda Y., Ohashi K., Shibata R., Pimentel D.R., Kihara S., Ouchi N., and Walsh K. (2008). Cyclooxygenase-2 induction by adiponectin is regulated by a sphingosine kinase-1 dependent mechanism in cardiac myocytes. *FEBS Lett*. **582**: 1147–1150.

Jaswal J.S., Keung W., Wang W., Ussher J.R., and Lopaschuk G.D. (2011). Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation – A novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta*. **1813**: 1333-1350.

Jones G., Prosser D.E., and Kaufmann M. (2014). Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *J Lipid Res*. **55**: 13–31.

Kang J. and Pervaiz S. (2012). Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. *Biochem Res Int*. **2012**: 1-14.

Kashiwagi H., Tomiyama Y., Honda S., Kosugi S., Shiraga M., Nagao N., Sekiguchi S., Kanayama Y., Kurata Y., and Matsuzawa Y. (1995). Molecular basis of CD36 deficiency. Evidence that a 478C→T substitution (proline90→serine) in CD36 cDNA accounts for CD36 deficiency. *J Clin Invest*. **95**: 1040-1046.

Kashiwagi H., Tomiyama Y., Kosugi S., Shiraga M., Lipsky R.H., Kanayama Y., Kurata Y., and Matsuzawa Y. (1994). Identification of molecular defects in a subject with type I CD36 deficiency. *Blood*. **83**: 3545-3552.

Kashiwagi H., Tomiyama Y., Nozaki S., Honda S., Kosugi S., Shiraga M., Nakagawa T., Nagao N., Kanakura Y., Kurata Y., and Matsuzawa Y. (1996). A single nucleotide insertion in codon 317 of the CD36 gene leads to CD36 deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **16**: 1026-1032.

Kashiwagi H., Tomiyama Y., Nozaki S., Kiyoi T., Tadokoro S., Matsumoto K., Honda S., Kosugi S., Kurata Y., and Matsuzawa Y. (2001). Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological characterization of two novel mutations that cause CD36 deficiency in man. *Hum Genet*. **108**: 459-466.

Katz A.M. (2011). Physiology of the heart. 5th edition.

King K.L., Stanley W.C., Rosca M., Kerner J., Hoppel C.L., and Febbraio M. (2007). Fatty acid oxidation in cardiac and skeletal muscle mitochondria is unaffected by deletion of CD36. *Arch Biochem Biophys.* **467**: 234-238.

Komajda M. and Charron P. (2002). Cardiomyopathies primitives. *Rev Prat.* **52**: 1664-1670.

Kuang M., Febbraio M., Wagg C., Lopaschuk G.D., and Dyck J.R. (2004). Fatty acid translocase/CD36 deficiency does not energetically or functionally compromise hearts before or after ischemia. *Circulation.* **109**: 1550–1557.

Kuda O., Pietka T.A., Demianova Z., Kudova E., Cvacka J., Kopecky J., and Abumrad N.A. (2013). Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signalling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J Biol Chem.* **288**: 15547-15555.

Kudo N., Gillespie J.G., Kung L., Witters L.A., Schulz R., Clanachan A.S., and Lopaschuk G.D. (1996). Characterization of 5'_AMP-activated protein kinase activity in the heart and its role in inhibiting acetyl-CoA carboxylase during reperfusion following ischemia. *Biochim Biophys Acta.* **1301**: 67–75.

Kunjathoor V.V., Febbraio M., Podrez E.A., Moore K.J., Andersson L., Koehn S., Rhee J.S., Silverstein R., Hoff H.F., and Freeman M.W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem.* **277**: 49982–49988.

Lanfear D.E.(2010). Genetic variation in the natriuretic peptide system and heart failure. *Heart Fail Rev.* **15** : 219-228.

Lee M.H., Klein R.L., El-Shewy H.M., Luttrell D.K., and Luttrell L.M. (2008). The adiponectine receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. *Biochemistry.* **47**: 11682-11692.

Li L., Wu L., Wang C., Liu L., and Zhao Y. (2007). Adiponectin modulates carnitine palmitoyltransferase-1 through AMPK signaling cascade in rat cardiomyocytes. *Regul Pept.* **139**: 72-79.

Liu Q., Docherty J.C., Rendell J.C., Clanachan A.S., and Lopaschuk G.D. (2002). High levels of fatty acids delay the recovery of intracellular pH and cardiac efficiency in post-ischemic hearts by inhibiting glucose oxidation. *J Am Coll Cardiol.* **39**: 718–725.

Lloyd-Jones D., Adams R., Carnethon M., De Simone G., Ferguson T.B., Flegal K., Ford E., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lackland D., Lisabeth L., Marelli A., McDermott M., Meigs J., Mozaffarian D., Nichol G., O'Donnell C., Roger V., Rosamond W., Sacco R., Sorlie P., Stafford R., Steinberger J., Thom T., Wasserthiek-Smoller S., Wong N., Wylie-Rosett J., and Hong Y. (2009). Heart disease and stroke statistics—2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. **119**: e21–e181.

Locatelli V., Rossoni G., Schweiger F., Torsello A., De Gennaro Colonna V., Bernareggi M., Deghenghi R., Müller E.E., and Berti F. (1999). Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology*. **140**: 4024-4031.

Lopaschuk G.D., Ussher J.R., Folmes C.D.L., Jaswal J.S., and Stanley W.C. (2010). Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. **90**: 207–258.

Luiken J.J.F.P., Schaap F.G., Van Nieuwenhoven F.A., van der Vusse G.J., Bonen A., and Glatz J.F.C. (1999). Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids*. **34**: S169-S175.

Luiken J.J.F.P., Coort S.L.M., Koonen D.P.Y., van der Horst D.J., Bonen A., Zorzano A., and Glatz J.F.C. (2004). Regulation of cardiac long-chain fatty acid and glucose uptake by translocation of substrate transporters. *Pflugers Arch*. **448**: 1–15.

Luiken J.J.F.P., Koonen D.P.Y., Willems J., Zorzano A., Fischer Y., van der Vusse G.J., Bonen A., and Glatz J.F.C. (2002). Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36, *Diabetes*. **51**: 3113–3119.

Mao X., Kikani C.K., Rojas R.A., Langlais P., Wang L., Ramos F.J., Fang Q., Christ-Roberts C.Y., Hong J.Y., Kim R.Y., Liu F., and Dong L.Q. (2006). APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling function. *Nat. Cell Biol*. **8**: 516-523.

Matsuda M. and Shimomura I. (2014). Roles of adiponectine and oxidative stress in obesity associated metabolic and cardiovascular diseases. *Rev Endocr Metab Disord*. **15**: 1-10.

Martel C., Huynh L.H., Garnier A., Ventura-Clapier R., and Brenner C. (2012). Inhibition of the mitochondria permeability transition for cytoprotection: direct versus indirect mechanisms. *Biochem Res Int*. **2012**: 1-13.

Marleau S., Harb D., Bujold K., Avallone R., Iken K., Wang Y., Demers A., Sirois M.G., Febbraio M., Silverstein R.L., Tremblay A., and Ong H. (2005). EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J.* **19**: 1869-1871.

Marleau S., Mulumba M., Lamontagne D., and Ong H. (2006). Cardiac and peripheral actions of growth hormone and its releasing peptides: relevance for the treatment of cardiomyopathies. *Cardiovasc Res.* **69**: 26-35.

Masoro E.J., Austad S.N. (2010). Handbook of the Biology of Aging. 7^e edition. Academic Press.

Mercier E. and Perrotin D. (2003). L'hépatite ischémique. *Réanimation.* **12**: 449-454.

Michael L.H., Entman M.L., Hartley C.J., Youker K.A., Zhu J., Hall S.R., Hawkins H.K., Berens K., and Ballantyne C.M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* **269**: H2147-H2154.

Miyaoka K., Kuwasako T., Hirano K., Nozaki S., Yamashita S., and Matsuzawa Y. (2001). Human CD36 deficiency is associated with insulin resistance. *Lancet.* **357**: 686-687.

Molkentin J.D. (2003). A friend within the heart : natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest.* **111** : 1275-77.

Mueller H.S. and Ayres S.M. (1980). Propranolol decreases sympathetic nervous activity reflected by plasma catecholamines during evolution of myocardial infarction in man. *J Clin Invest.* **65**: 338-346.

Munshi N.V., McAnally J., Bezprozvannaya S., Berry J.M., Richardson J.A., Hill J.A., Olson E.N. (2009). Cx30.2 enhancer analysis identifies Gata4 as a novel regulator of atrioventricular delay. *Development.* **136**: 2665-2674.

Murphy E. and Steenbergen C. (2008). Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol rev.* **88**: 581-609.

Nagendran J., Waller T.J., and Dyck J.R.B. (2013). AMPK signalling and the control of substrate use in the heart. *Molecular and Cellular Endocrinology.* **366**: 180-193.

Nanayakkara G., Kariharan T., Wang L., Zhong J., and Amin R. (2012). The cardio-protective signaling and mechanisms of adiponectin. *Am J Cardiovasc Dis.* **2**: 253-266.

Neely J.R. and Morgan H.E. (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Ann. Rev. Physiol.* **36**: 413-459.

Nergiz-Unal R., Rademakers T., Cosemans J.M., and Heemskerk J.W. (2011). CD36 as a multiple-ligand signaling receptor in atherothrombosis. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* **9**: 42-55.

Ouchi N., Kihara S., Arita Y., Okamoto Y., Maeda K., Kuriyama H., Hotta K., Nishida M., Takahashi M., Muraguchi M., Ohmoto Y., Nakamura T., Yamashita S., Funahashi T., and Matsuzawa Y. (2000). Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation.* **102**: 1296–1301.

Ouchi N., Kihara S., Funahashi T., Matsuzawa Y., and Walsh K. (2003). Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol.* **14**: 561-566.

Ouchi N. and Walsh K. (2008). A novel role for adiponectin in the regulation of inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **28**: 1219-1221.

Park S.K., Oh S.Y., Lee M.Y., Yoon S., Kim K.S., and Kim J.W. (2004). CCAAT/enhancer binding protein and nuclear factor-Y regulate adiponectin gene expression in adipose tissue. *Diabetes.* **53**: 2757-2766.

Park Y.M., Febbraio M., Silverstein R.L. (2009). CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and contributes to macrophage trapping in the arterial intima. *J. Clin. Invest.* **119**: 136–145.

Parker-Duffen J.L., Nakamura K., Silver M., Kikuchi R., Tigges U., Yoshida S., Denzel M.S., Ranscht B., and Walsh K. (2013). T-cadherin is essential for adiponectine-mediated revascularization. *J Biol Chem.* **288**: 24886-24897.

Pasquier C. (1995). Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires.* **276**: 87-92.

Piper H.M., Abdallah Y., and Schäfer C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* **61**: 365-371.

Pischon T., Girman C.J., Hotamisligil G.S., Rifai N., Hu F.B., and Rimm E.B. (2004). Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *J Am Med Assoc.* **291**: 1730-1737.

Poortmans J.R. and Boisseau N. (2009). Biochimie des activités physiques et sportives. Groupe de Boeck. **Chapitre 6**: 160-69.

Proulx C., Sabatino D., Hopewell R., Spiegel J., Ramos Y.G., and Lubell W.D. (2011). Azapeptides and their therapeutic potential. *Future Med Chem.* **3**: 1139-1164.

Proulx C., Picard É., Boeglin D., Pohankova P., Chemtob S., Ong H., and Lubell W.D. (2012). Azapeptide analogues of the growth hormone releasing peptide 6 as cluster of differentiation 36 receptor ligands with reduced affinity for the growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem.* **55**: 6502-6511.

Puente Navazo M.D., Daviet L., Ninio E., and McGregor J.L. (1996). Identification on human CD36 of a domain (155–183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**: 1033–1039.

Qiang L., Wang H., and Farmer S.R. (2007). Adiponectin secretion is regulated by SIRT1 and the endoplasmic reticulum oxidoreductase Ero1-L alpha. *Mol Cell Biol.* **27**: 4698-4707.

Rač M.E., Safranow K., and Poncyljusz W. (2007). Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med.* **13**: 288-296.

Raedschelders K., Ansley D.M., and Chen D.D.Y. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther.* **133**: 230-255.

Reeves R.C., Evanochko W.T., Canby R.C., McMillin J.B., and Pohost G.M. (1989). Demonstration of increased myocardial lipid with postischemic dysfunction ("myocardial stunning") by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Coll Cardiol.* **13**: 739-744.

Jin R., Yang G., and Li G. (2010). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol.* **87**: 779–789.

Rosamond W., Flegal K., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Hailpern S.M., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lloyd-Jones D., McDermott M., Meigs J., Moy C., Nichol G., O'Donnell C., Roger V., Sorlie P., Steinberger J., Thom T., Wilson M., and Hong Y. (2008). Heart disease and stroke statistics–2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. **117**: e25–e146.

Rossoni G., de Gennaro Colonna V., Bernareggi M., Polvani G.L., Müller E.E., and Berti F. (1998). Protectant activity of Hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. **32**: 260–265.

Sabatino D., Proulx C., Klocek S., Bourguet C.B., Boeglin D., Ong H., and Lubell W.D. (2009). Exploring side-chain diversity by submonomer solid-phase aza-peptide synthesis. *Org Lett*. **11**: 3650-3653.

Sabatino D., Proulx C., Pohankova P., Ong H., and Lubell W.D. (2011). Structure – Activity relationships of GHRP-6 azapeptide ligands of the CD36 scavenger receptor by solid-phase submonomer azapeptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 12493-12506.

Saito Y. (2010). Roles of atrial natriuretic peptide and its therapeutic use. *J Cardiol*. **56**: 262-270.

Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., and Kunz W.S. (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem*. **184**: 81-100.

Schwenk R.W., Luiken J.J.F.P., Bonen A., and Glatz J.F.C. (2008). Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res*. **79**: 249-258.

Schwenk R.W., Holloway G.P., Luiken J.J.F.P., Bonen A., and Glatz J.F.C. (2010). Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. **82**: 149-154.

Sharma S., Adroque J.V., Golfman L., Uray I., Lemm J., Youker K., Noon G.P., Frazier O.H., and Taegtmeyer H. (2004). Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J*. **18**: 1692-1700.

Shibata R., Sato K., Pimentel D.R., Takemura Y., Kihara S., Ohashi K., Funahashi T., Ouchi N., and Walsh K. (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK-and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med.* **11**: 1096-1103.

Shoba S., Christine M.K., and Philipp E.S. (2009). Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends Pharmacol Sci.* **30**: 234-239.

Silverstein R.L. (2009). Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36. *Cleve Clin J Med.* **76**: S27-S30.

Silverstein R.L. (2009). Type 2 scavenger receptor CD36 in platelet activation: the role of hyperlipemia and oxidative stress. *Clin Lipidol.* **4**: 767.

Silverstein R.L., Li W., Park Y.M., and Rahaman S.O. (2010). Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* **121**: 206-220.

Singh G.M., Danaei G., Farzadfar F., Stevens G.A., Woodward M., Wormser D., Kaptoge S., Whitlock G., Qiao Q., Lewington S., Di Angelantonio E., Vander Hoorn S., Lawes C.M., Ali M.K., Mozaffarian D., and Ezzati M. (2013). The age-specific quantitative effects of metabolic risk factors on cardiovascular diseases and diabetes: a pooled analysis. *PLoS One.* **8**: e65174.

Stocchi V., De Feo P., and Hood D.A. (2007). Role of Physical Exercise in Preventing Disease and Improving the Quality of Life. Édition Springer. **Chapitre 9**: 145-158.

Stowe D.F. and Camara A.K. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxid Redox Signal.* **11**: 1373-1414.

Tanaka T. and Kawamura K. (1995). Isolation of myocardial membrane long-chain fatty acid-binding protein: homology with a rat membrane protein implicated in the binding or transport of long-chain fatty acids. *J Mol Cell Cardiol.* **27**: 1613-1622.

Tao L., Gao E., Jiao X., Yuan Y., Li S., Christopher T.A., Lopez B.L., Koch W., Chan L., Goldstein B.J., and Ma X.L. (2007). Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation.* **115**: 1408-1416.

Tarnavski O., McMullen J.R., Schinke M., Nie Q., Kong S., and Izumo S. (2003). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics*. **16**: 349-360.

Tsao T.S., Murrey H.E., Hug C., Lee D.H., and Lodish H.F. (2002). Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem*. **277**: 29359-29362.

Vigue-Martin (2006). Grand atlas d'anatomie humaine. Maree haute.

Villarreal-Molina M.T. and Antuna-Puente B. (2012). Adiponectin: Anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie*. **94**: 2143-2149.

von Bergen N.H., Koppenhafer S.L., Spitz D.R., Volk K.A., Patel S.S., Roghair R.D., Lamb F.S., Segar J.L., and Scholz T.D. (2009). Fetal programming alters reactive oxygen species production in sheep cardiac mitochondria. *Clin Sci (Lond)*. **116**: 659-668.

Wang T., Yao S., Xia Z., and Irwin M.G. (2013). Adiponectin: mechanisms and new therapeutic approaches for restoring diabetic heart sensitivity to ischemic post-conditioning. *Front Med*. **7**: 301-305.

Wang Y., Xu A., Knight C., Xu L.Y., and Cooper G.J. (2002). Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem*. **277**: 19521–19529.

Wang Y., Lau W.B., Gao E., Tao L., Yuan Y., Li R., Wang X., Koch W.J., and Ma X. (2010). Cardiomyocyte-derived adiponectin is biologically active in protecting against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **298**: E663-E670.

Wang H., Sreenivasan U., Gong D.W., O'Connell K.A., Dabkowski E.R., Hecker P.A., Hecker P.A., Ionica N., Konig M., Mahurkar A., Sun Y., Stanley W.C., and Sztalryd C. (2013). Cardiomyocyte-specific perilipin 5 overexpression leads to myocardial steatosis and modest cardiac dysfunction. *J. LipidRes*. **54**: 953–965.

Xu A. and Vanhoutte P.M. (2012). Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **302**: H1231-H1240.

Yamauchi T., Kamon J., Ito Y., Tsuchida A., Yokomizo T., Kita S., Sugiyama T., Miyagishi M., Hara K., Tsunoda M., Murakami K., Ohteki T., Uchida S., Takekawa S., Waki H., Tsuno N.H., Shibata Y., Terauchi Y., Froguel P., Tobe K., Koyasu S., Taira K., Kitamura T., Shimizu T., Nagai R., and Kadowaki T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. **423**: 762-769.

Yang J., Sambandam N., Han X., Gross R.W., Courtois M., Kovacs A., Febbraio M., Finck B.N., and Kelly D.P. (2007). CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy. *Circ Res*. **100**: 1208-1217.

Zhu W., Cheng K.K., Vanhoutte P.M., Lam K.S., and Xu A. (2008). Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)*. **114**: 361-374.